МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
«ХАРЬКОВСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ»

С. А. Гринь, И. В. Питак, Н. В. Кошовец, В. А. Пономарёв

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ ПЕРЕРАБОТКЕ ОТХОДОВ

Учебное пособие

Харьков 2016

УДК 66(075)+66.02(075)+661(075)

ББК 35я73

С. А. Гринь, И. В. Питак, Н. В. Кошовец, В. А. Пономарёв: Биотехнологическиепроцессы при переработке отходов: Учеб. пособ. – Харьков:, 2016. – 156 с.

ISBN 978-617-7319-08-4

Для студентов специальности «Экология и охрана окружающей среды»

Ил. 21. Табл. 7. Библиогр.: 16 наим.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

Современная биотехнология – это направление, призванное изыскивать пути промышленного применения биологических агентов и процессов. Это комплексная многопрофильная область, включающая микробиологический синтез, генетическую, белковую и клеточную инженерию, инженерную энзимологию.

Биотехнология в основном опирается на использование микроорганизмов. Поэтому знания, накопленные микробиологией о многообразии мира, о строении, генетике, физиологии, изменчивости, экологии микробов создают научную основу для развития многих биотехнологических производств. Традиционное сырье для различных отраслей химической и перерабатывающей промышленности (нефть и газ) истощается, а это приведет к тому, что всё более широко будут использоваться ресурсы биомассы.

Помимо новых способов получения химических веществ из биомассы, биотехнология дает нам также более эффективные и производственные катализаторы для осуществления химических взаимопревращений.

Многообещающей областью дальнейшего развития представляется производство ценных веществ из растений, например терпенов и алкалоидов, используемых при производстве лекарств; в настоящее время 25 % всех лекарств производится из растений. С помощью животных клеток возможна продукция вирусов для получения вакцин. В перспективе это вирусы гепатита А, гепатита Б, герпеса типа 1, герпеса типа 2, а также вирусы, вызывающие простудные заболевания, некоторые формы рака и зубной кариес.

Открытие века на грани фантастики – получение животного – овцы – из донорской клетки другой овцы с помощью клеточной инженерии, а в перспективе – любого млекопитающего и даже человека.

В области сельского хозяйства решаются вопросы создания полноценных кормов для животных на основе белка одноклеточных. Для переработки отходов сельскохозяйственного производства используются биотехнологические процессы с помощью анаэробных и аэробных, термофильных бактерий. Созданы новые бактериальные удобрения. На пороге нового века создается катализатор,

моделирующий нитрогеназу и способный катализировать фиксацию молекулярного азота и воздуха при нормальном давлении и температуре с малой энергоемкостью процесса. Прежде всего, биотехнология перспективна с экологической точки зрения. С момента возникновения цивилизации на Земле остро стоит экологическая проблема охраны окружающей среды.

Благодаря антропогенной деятельности человека (промышленной, сельскохозяйственной, бытовой и т.д.) постоянно происходят изменения физических, химических и биологических свойств окружающей среды, причем многие из этих изменений весьма неблагоприятны. Прогнозируется, что биотехнология будет оказывать многообразное и всё возрастающее влияние на способы контроля за окружающей средой и на её состояние.

Прекрасным примером такого влияния служит внедрение новых, более совершенных методов биотехнологической переработки отходов, применение биотехнологии в борьбе против распространения ксенобиотиков и нефтяных загрязнений.

Сегодня быстро развиваются разнообразные отрасли промышленности, в которых процессы жизнедеятельности микроорганизмов используются для создания замкнутых систем, для контроля за загрязнением сточных вод, биотестирования, для использования альтернативных энергоресурсов и химического сырья как в промышленности, так и в сельском хозяйстве.

Основные задачи, которые решает биотехнология в деле охраны окружающей среды, следующие:

1) деградация органических и неорганических токсичных отходов;

2) возобновление ресурсов для возврата в круговорот веществ углерода, азота, фосфора и серы;

3) получение ценных видов органического топлива.

Рассмотрим одно из наиболее важных направлений биотехнологии – обработку сточных вод, твердых отходов, контроль за загрязнением окружающей среды и создание безотходных технологий.

В последнее время резко увеличилось количество и усложнился

качественный состав веществ, загрязняющих среду. Бурное развитие химии и её внедрение в народное хозяйство наряду с огромным экономическим эффектом и многими блестящими достижениями несет определенную опасность в смысле нарушения сложившихся в течение сотен тысяч лет биомов симбиотирующих и взаимодополняющих обитателей биосферы. Наиболее опасно загрязнение окружающей среды вредными для здоровья человека ядовитыми, канцерогенными и мутагенными веществами и ксенобиотиками, несвойственными природе, трудно разлагаемыми веществами (пестицидами, детергентами, полимерами), приводящее к деградации естественных биоценозов, снижению продуктивности почв и водоемов. Обогащение водоемов питательными веществами, в первую очередь азотными фосфатными удобрениями, приводит к чрезмерному развитию альгофлоры и некоторых других организмов, снижению количества растворенного кислорода и продуктивности водоемов.

Проблема сточных вод тесно связана с другой актуальнейшей проблемой современности – дефицитом чистой воды. Еще несколько десятилетий назад считали, что водные ресурсы безграничны. Но уже к началу 70-х годов более 200 млн. человек были лишены чистой питьевой воды и каждая четвертая больничная койка в мире была занята пациентом, пострадавшим от потребления недоброкачественной воды. По подсчетам некоторых ученых человечество может остаться без пресной воды в XXI в. Особенно большие надежды в решении этих проблем ученые возлагают на развитие биотехнологии.

По данным некоторых авторов, намечено получение новых штаммов микроорганизмов, способных к полной деструкции стойких промежуточных продуктов разложения пестицидов, гербицидов, лигноцеллюлозы, к удалению тяжелых металлов. Предполагается получение штаммов, способных оздоровить почву, воду рек и океанов.

РАЗДЕЛ 1. ПРЕДМЕТ, ОБЪЕКТЫ И ЗАДАЧИ БИОТЕХНОЛОГИИ

1.1. Предмет и объекты биотехнологии

Термин “биотехнология” имеет два значения: с одной стороны, это отрасль производства, основанная на использовании биологических и микробиологических объектов, а с другой стороны, это комплексное научно-техническое направление, изучавшее эти процессы.

Биотехнология опирается на древнейшие традиции бродильных и микробиологических производств, а также на результаты новейших открытий в области генетической инженерии и инженерной энзимологии.

Кроме того, на основе биотехнологических схем могут быть созданы разнообразные энергетические установки – от получения биогаза до имитации процесса фотосинтеза.

Биотехнологические процессы в отличие от химических могут осуществляться при невысоких давлениях и температурах, меньше загрязнять окружающую среду, так как многие микробиологические производства могут работать как безотходные. В понятие “биотехнология” включают комплекс производственных процессов, основанных на использовании биокатализаторов, микроорганизмов и различных биологических систем (культур растительных и животных тканей и клеток, протопластов и др.). Биологические промышленные процессы могут осуществляться микроорганизмами, водорослями, простейшими, культурами клеток и тканей животных, растений, ферментами, мембранами и клеточными организмами в свободном или иммобилизированном состоянии.

Таким образом, биотехнология может внести существенный вклад в решение экологических, энергетических и сырьевых проблем.

1.2. Биотехнология как комплексное научное направление

Современная биотехнология (рис. 1.1) использует достижения наук биологического цикла, изучающих надорганизменный уровень (экология и др.), биологические организмы (микробиология, микология и т.д.), суборганизменные структуры (молекулярная биология, генетическая инженерия и т.д.). На развитие биотехнологии как опосредованно (через биологию), так и непосредственно

влияют химия, физика, математика, кибернетика, механика.

Биотехнология как научное направление представляет собой не просто сумму отдельных положений, лежащих в ее основе, а систему научных знаний о строении, физиологии, биохимии, генетике биологических объектов, их взаимоотношениях в ассоциациях, методах воздействия на продуцента (селекция, мутагенез, генетическая инженерия) и выделение из них компонентов, осуществляющих процессы, об иммобилизации, о кинетике процессов, влиянии на их течение различных факторов, о способах регуляции и управлении этими процессами, об основах массо- и энергопереноса, методах экспериментального и математического моделирования, научных основах создания аппаратуры и автоматизации процессов и т.д. Биотехнология как научное направление имеет свой объект и собственный методологический аппарат. Один из главных методов исследований в области биотехнологии – это эксперименты в лабораторных, опытных и опытно-промышленных и промышленных установках.

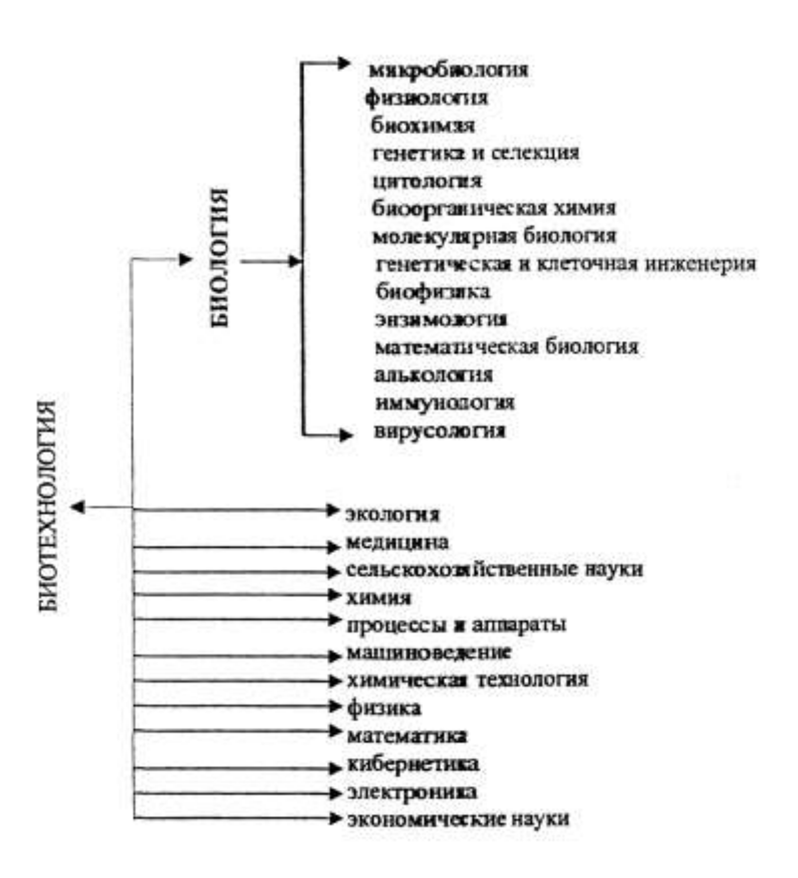


Рисунок 1.1 Взаимосвязь биотехнологии с биологическими и естественными науками

1.3. Субстраты для культивирования биообъектов

Питательная среда обеспечивает жизнедеятельность, рост и развитие биообъектов, эффективный синтез целевого продукта. Неотъемлемой частью питательной среды служит вода, все процессы жизнедеятельности протекают только в водной среде. Питательные вещества образуют в среде истинные (минеральные соли, сахара, аминокислоты, карбоновые кислоты, спирты, альдегиды и т.д.) или коллоидные (белки, липиды, неорганические соединения типа гидроксида железа) растворы. Отдельные компоненты питательной среды могут находиться в твердом агрегатном состоянии – они могут всплывать на поверхность раствора (частица угля, серы), равномерно распределяться по всему объему в виде взвеси или образовывать придонный осадок. Жидкие углеводороды при внесении в воду формируют особую несмешивающуюся фазу. При твердофазном культивировании вода только увлажняет твердую поверхность субстрата. Вещества, необходимые для культивирования, могут представлять собой газы, растворимые в воде: хорошо (HH_3, H_2S), умеренно (CO_2) или плохо (N_2O_2, H_2, CH_4)

Питательные среды могут иметь неопределенный состав, т.е. включать биогенные (растительные, животные, микробные) добавки – мясной экстракт, кукурузную муку, морские водоросли и т.д. Подобные среды обычно готовят на водопроводной воде. Применяют также среды, приготовленные из чистых химических соединений в заранее определенных соотношениях, так называемые синтетические среды. Смесь веществ, как правило, вносят в дистиллированную воду (иногда бидистиллированную).

Среды обоих типов имеют как преимущества, так и недостатки. С экономической точки зрения наиболее целесообразно употребление природного более дешевого сырья, а не смеси веществ, полученных в чистом виде. Однако только применение сред строго определенного состава позволяет точно регистрировать и регулировать протекающие в биореакторе процессы, добиваться их оптимизации. Компромиссным подходом является использование полусинтетических сред, в состав которых вместе с соединениями известной

химической природы входят биогенные добавки.

Компонентный состав зависит от пищевых потребностей биообъекта. Автотрофные организмы синтезируют органические вещества клеток из CO_2 и H_2O с утилизацией энергии света (фотоавтотрофы) или химических реакций окисления (хемоавтотрофы), поэтому питательные среды для таких биообъектов могут не содержать органических соединений. Очень простые по составу среды необходимы для культивирования цианобактерий: источником энергии служит свет, оксид углерода – CO_2 (или карбонаты), азот – N_2 атмосферы (многие цианобактерий способны к его усвоению). Смесь минеральных добавок в последние годы вносят в виде тех или иных комбинаций из сельскохозяйственных удобрений.

Несложен рецепт приготовления среды также для хемоавтотрофных организмов, вызывающих окисление металлов в рудах и тем самым переводящих их в растворимое состояние (выщелачивание металлов из руд). Породу, из которой требуется извлечь остаточные количества ценного металла, обливают водой, а соответствующие микроорганизмы развиваются в породе без каких-либо дальнейших добавок.

Во многих разработках используют биообъекты, требующие органических источников углерода и (или) энергии. Раньше такие организмы называли гетеротрофами, ныне они подразделяются на органоавтотрофы (употребляющие органические вещества как источник энергии), литогетеротрофы (использующие органические вещества как источник углеводорода) и органогетеротрофы (для которых органические вещества – источник и углерода, и энергии). Применяемые в биотехнологии органические вещества разнообразны и отражают специфику объекта и критерии технологической и экономической целесообразности. Примеры наиболее распространенных субстратов для получения белка одноклеточных приведены на рис. 1.2.

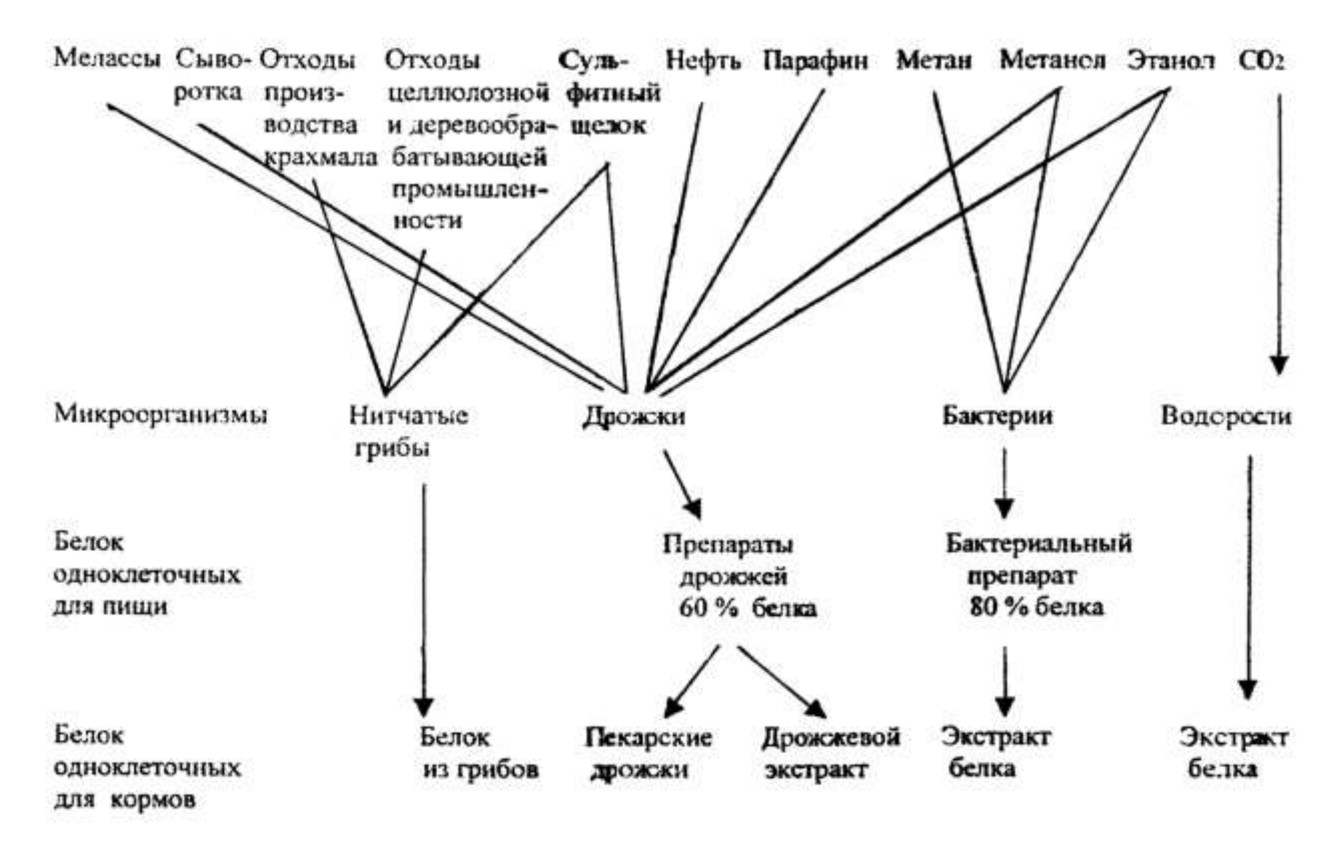


Рисунок 1.2 Субстраты для получения белка одноклеточных для разных организмов

С технико-экономической точки зрения субстрат представляет собой сырье для получения целевого продукта. Сырье должно быть недефицитным, недорогим, по возможности легкодоступным. Применяют и дорогостоящее сырье, но в этом случае требуется покрытие расходов прибылью от сбыта продукта.

Хорошим примером недефицитного и дешевого сырья служит меласса, побочный продукт получения сахара (рис. 1.2). Однако в последние годы спрос на мелассу значительно превышает имеющиеся ресурсы, поэтому ее стремятся заменить другими органическими субстратами. Распространенными источниками углерода и энергии являются компоненты нефти и природного газа. В состав сырой нефти входит большое количество разнообразных органических (предельные, непредельные, ароматические и их производные) и неорганических (соединения серы) веществ, микроорганизмы обычно не способны усваивать все фракции одновременно, хотя, как отмечалось, выведен штамм псевдомонад, утилизирующий основные компоненты сырой нефти. Это обуславливает

необходимость разделения нефти на фракции, что достигается путем ее перегонки или крекинга (превращение длинноцепочечных углеводородов в короткоцепочечные).

Если компоненты нефти служат сырьем для получения пищевого (кормового) белка или препарата медицинского назначения, необходима их тщательная очистка от канцерогенных веществ. Наилучшим субстратом из числа компонентов нефти являются н-алканы, особенно жидкие с числом углеродных атомов от 10 до 20, к их утилизации способно большинство бактерий и дрожжевых грибков. Практически все сказанное о нефти относится и к природному газу – сложной смеси органических (углеводороды и их производные) и неорганических (CO_2, CO, H_2, H_2S ,SO_2, NH_3) веществ. В его составе имеются пары углеводородов, отделяемых в воде, газового конденсата (C_{10}–C_{20}).

Однако ограниченность ресурсов нефти и газа вынуждает биотехнологов изыскивать иные, в первую очередь возобновляемые источники сырья. Большое внимание уделяют различным видам растительной массы: плодам, сокам, клубням, травяной массе, древесине. Применяют отходы сельского хозяйства, деревообрабатывающей и бумажной промышленности, что позволяет реализовать с помощью биотехнологии принцип безотходного производства.

Половину высушенной растительной массы составляет целлюлоза – самый распространенный биополимер. Как полисахарид, целлюлоза представляет собой ценный источник углерода и энергии. Необходимым этапом подготовки этого сырья к биотехнологическому использованию является гидролиз до простых водорастворимых сахаров (глюкоза, целлобиоза), что до сих пор представляет сложную задачу. Наибольшие трудности возникают при утилизации древесины, где целлюлоза образует комплекс с гемицеллюлозами и лигнином. Лигнин сильно затрудняет и химический, и ферментативный гидролиз целлюлозы, так как препятствует доступу к ней реагентов и катализаторов, а в случае ферментативного гидролиза лигнин активно адсорбирует целлюлозолитические ферменты, выводя их из строя.

Дополнительной задачей этого этапа является разрыхление целлюлозы, разрушение ее кристаллической структуры, что значительно облегчает ее последующее расщепление. Предгидролиз осуществляется обработкой растительного материала щелочами или кислотами в низких концентрациях, в том числе угольной кислотой; гидролиз ведут в атмосфере паров воды и CO_2 при 200 °С. Получаемый на этом этапе предгидролизат сам по себе представляет ценный субстрат для биотехнологических целей. Широко распространенным методом отделения лигнина (делигнификации древесины) служит обработка SO_2, при этом образуется побочный продукт, так называемые сульфитные щелока, которые используются как субстрат в микробиологическом производстве (рис.1.2).

Последующий гидролиз целлюлозы проводят с помощью концентрированных кислот при высоких температурах и давлении, с применением оборудования из прочных и коррозионно-стойких материалов. В поисках методов, позволяющих упростить и удешевить оборудование, биотехнология в последнее время обращается к "газообразным кислотам" – SO_2 (который при взаимодействии с водой образует H_2SO_3) и CO_2 (переходящий в H_2CO_3). Это объясняется действием продуктов радиолиза CO_2. Перспективным направлением является также ферментативный гидролиз целлюлозы.

Гемицеллюлозы, основным компонентом которых служит ксилан (полимер, построенный из остатков ксилозы и небольшого количества арабинозы и глюкуроновой кислоты), – это не только отход, отделяемый при гидролизе растительного сырья, но и вещество, имеющее самостоятельное значение в качестве биотехнологического сырья. Ксилан – второй по распространенности растительный биополимер. Химический гидролиз ксилана происходит с образованием веществ, токсичных для микроорганизмов. В связи с этим в последние годы осваивают ферментативный гидролиз ксилана.

Биотехнология не ограничивается применением растительных отходов. Наблюдается тенденция к созданию биотехнологических цепочек, когда отходы или побочные продукты одного биотехнологического процесса используются как

дешевое сырье для другого. На отходах, остающихся при микробиологическом получении этанола, можно выращивать кормовые дрожжи. Разработан способ получения биомассы, при котором на гидролизатах растительного сырья выращивают дрожжи, а фильтрат культуральной жидкости затем идет на синтез грибного белка. Известен также способ производства дрожжевой массы на фильтратах культуральной жидкости грибов. Предполагают использовать биомассу одного вида организма как субстрат для культивирования другого. Преимущества такого подхода в том, что малоценное сырье, на котором не растет непосредственно продуцент, может служить подходящим субстратом для культивирования клеток, “скармливаемых” этому продуценту.

В последние годы все возрастающее значение приобретает твердофазное культивирование, позволяющее резко снизить издержки производства, связанные с конструированием и эксплуатацией биореакторов. Рассматриваемый метод культивирования восходит к глубокой древности: в Японии он издавна известен как способ производства кодзи-продукта, аналогичного по свойствам ячменному солоду. Традиционная японская пища мисо готовится путем заражения твердой массы соевых бобов грибами рода Aspergillus, предварительно выращенными на зернах риса. Большие надежды на твердофазное культивирование возлагают в связи с биоконверсией растительного сырья, в том числе прямого превращения целлюлозы, ксилана, крахмала, хитина в этанол, ацетат и другие низкомолекулярные вещества.

Интересной идеей является освоение газообразных питательных сред. В газообразном состоянии при комнатной температуре находятся многие биологические субстраты; список веществ удлиняется еще более при культивировании термофильных и особенно экстремально термофильных микроорганизмов. Такие субстраты как H_2, CH_4, CO_2 плохо растворимы в воде, поэтому для решения проблемы массопередачи из газа в жидкость их приходится пропускать через культуральную среду. Известно в то же время, что микроорганизмы могут длительное время жить и развиваться во взвешенном состоянии – в виде аэрозолей в увлажненном воздухе или смеси газов,

содержащей необходимый для культивирования субстрат. Представляется заманчивым создание газофазного биореактора.

Таким образом, биотехнология в настоящее время все более ориентируется на разнообразные виды недорогого, доступного и возобновляемого сырья, наиболее важным видом которого является растительная масса. При конверсии субстратов в биотехнологических процессах стремятся наладить безотходное производство, когда отходы одного процесса служат сырьем для последующего.

1.4. Технологические основы биотехнологических производств

Разработка и оптимизация научно обоснованной технологии и аппаратуры биотехнологических процессов – одна из самых важных задач в биотехнологии. В общем случае биотехнологический процесс включает:

– предферментативные процессы – прием, хранение и подготовку сырья и вспомогательных материалов; подготовку технологической и рециркулируемой воды и питательных субстратов, стерилизацию воздуха, воды, технологических сред, выращивание чистой культуры продуцента (подготовка инокулята);

– стадию ферментации, на которой собственно и происходит процесс получения целевых продуктов (биомассы, эндо- и экзопродуктов клеток);

– постферментационные стадии – приготовление готовой формы продукта (концентрирование, выделение, очистку, сушку, измельчение, смешение, стандартизацию, расфасовку и т.д.);

– очистку сточных вод и газовоздушных выбросов.

В зависимости от вида конкретного производства некоторые стадии могут иметь специфику или вообще отсутствовать.

Технология биотехнологических процессов и применяемая аппаратура во многом определяются используемым продуцентом (бактерии, дрожжи, грибы, актиномицеты, простейшие водоросли, клетки животных, растений, клеточные органеллы и т.д.). Наряду с использованием чистых культур (выделение из одной клетки) применяют ассоциации.

Культура продуцента в предферментативной стадии обычно выращивается

вначале в колбах и на качалке, а потом в специальных аппаратах – инокуляторах.

Эффективность биотехнологических производств во многом зависит от создания оптимальных условий развития продуцентов, для чего необходимо изучение их физиологии, т.е. поведения клеток и популяций, взаимодействия клеток со средой и метаболизма (обмена веществ), т.е. совокупности химических и физических процессов, обеспечивающих существование и воспроизведение клетки (организма).

Основная стадия, в значительной степени определяющая технологию и аппаратуру всего процесса, – ферментация. Она обычно осуществляется в биохимическом реакторе (ферментере). Ферментер – это реакционная емкость, в которой обеспечивается питательное и физиологическое окружение культуры, требуемое для ее роста и получения нужных продуктов метаболизма.

Ферментация может происходить в строго асептических (т.е. исключающих попадание посторонней микрофлоры) или не асептических условиях, на жидких или на твердых средах, в анаэробных (без доступа воздуха) или в аэробных (клетки находятся в постоянном контакте с кислородом) условиях. Аэробное выращивание может протекать при развитии продуцента на поверхности сред (поверхностное культивирование) или во всей толще питательной среды (глубинное культивирование).

Чаще в современной промышленности осуществляется непрерывный процесс в ферментерах полного смешения, где во всей массе среды создаются одинаковые условия (гомогенно-проточный способ). Это позволяет поддерживать на определенном уровне параметры внешней среды и устойчивое во времени состояние клеток и, следовательно, стабилизировать культуру в нужной для производства стадии. Принципы управления таким процессом могут быть различны.

Технический уровень всего производства, его эффективность качество продукции, а следовательно, и области применения, безопасность в отношении окружающей среды во многом определяются технологией и аппаратурой, применяющимися на стадиях выделения, очистки и сушки продукта. Трудность

постферментационных стадий биотехнологических производств связана с тем, что в результате ферментации образуются сложные смеси, содержащие клетки, внеклеточные метаболиты, неиспользованные компоненты среды и т.д. Биопрепараты в этой смеси содержатся в небольшой концентрации в среде или в клетках, где они часто связаны с клеточными органеллами. Кроме того, биопрепараты относятся к легко разрушаемым соединениям, и это накладывает существенные ограничения на выбор методов, используемых на конечных стадиях процесса. Для удовлетворения экологических требований в биотехнологических производствах предусмотрена очистка и рециркуляция культуральной жидкости, воздуха. На рис. 1.3 и 1.4 представлена систематизация процессов элементов – объектов используемых биотехнологией.



Рисунок 1.3 Процессы, составляющие биотехнологию



Рисунок 1.4 Объекты биологических производств

1.5. Классификация процессов биотехнологии

1. Процессы переработки продуктов питания и сельскохозяйственного сырья, в которых не осуществляется выращивание больших масс микроорганизмов и извлечение продуктов метаболизма (хлебопечение, производство сыра, напитков, силосование кормов и т.д.). Микроорганизмы обычно используются в любом количестве лишь на одной из стадий технологического процесса; специфическое технологическое оборудование, связанное с применением микроорганизмов, имеет здесь небольшой удельный вес, и усовершенствование технологии идет в основном за счет оборудования, не относящегося к биотехнологии.

2. Бродильные производства, с помощью которых получают некоторые органические кислоты, растворитель и энергетическое сырье (спирт, ацетон, бутанол и т.д.). Спецификой этих производств является то, что микроорганизмы можно культивировать в нестерильных условиях, поскольку температурный фактор или наличие спирта, сахара, кислот и других компонентов сред или продуктов метаболизма микроорганизмов ограничивает рост посторонней микрофлоры.

3. Биотехнологические процессы со специальным оборудованием и технологией, в которых микроорганизмы используются в производственных условиях для обработки сельскохозяйственных промышленных и бытовых отходов, очистки воды, почвы от загрязнений.

4. Получение в промышленных условиях биомассы для кормовых технологических целей. Процессы осуществляются в нестерильных условиях, но требуют специфического оборудования в зависимости от сырья.

5. Получение микробной и клеточной биомассы в асептических условиях для растениеводства, пищевых целей (бактериальные удобрения, пестициды, пищевой белок). Эти производства отличаются сложностью аппаратурного оформления процессов выращивания и очистки, что оправдывает их выделение в самостоятельную группу.

6. Получение для нужд промышленности, сельского хозяйства и медицины микробных метаболитов сложной органической структуры, большинство из

которых обладает физиологической активностью (антибиотики, витамины, ферменты, кровезаменители, аминокислоты, полисахариды и т.п.). Эти производства осуществляются в асептических условиях выращивания. Их особенностью является необходимость специального сложного оборудования и технологии их выделения и очистки целевого продукта.

7. Использование иммобилизованных ферментов и клеточных систем.

8. Трансформация органических веществ (получение стереоселективных сложных органических молекул).

9. Культивирование клеток многоклеточных организмов. Производство моноклональных антител (иммунная биотехнология). Клональное размножение важнейших сельскохозяйственных растений с помощью культур клеток и тканей, методов клеточной селекции, получение гаплоидов и гибридизация соматических клеток для создания исходных форм и сортов, оздоровление посадочного материала.

10. Применение микробиологических процессов в традиционно небиологических областях техники, например, обогащение руд, повышение нефтеотдачи пластов и т.д.

11. Применение методов генетической инженерии для получения новых микроорганизмов и клеток с заданными свойствами. В перспективе – конструирование пород животных и сортов растений. Протеоинженерия.

1.6. Взаимосвязь биотехнологии, экологии и химической технологии

Важную роль в экологических проблемах играет биотехнология. Сама экология в традиционном понимании – это биологическая дисциплина, изучающая взаимоотношение живых организмов, в том числе и человека, с окружающей средой. Биологизация производства, тесное сближение биологии и промышленной экологии – главные пути выхода из экологического кризиса.

Взаимодействие современной биотехнологии и экологии рассмотрено на рис. 1.5.



Рисунок 1.5 Взаимодействие биотехнологии и экологии

Биотехнология помогает решать ряд экологических проблем. В результате внедрения биотехнологических методов происходит более полная утилизация сырья, токсичных отходов, интенсификация выращивания и использования возобновляемых природных ресурсов, создание малоотходных и безотходных промышленных процессов.

В целом можно отметить, что биотехнология и экология могут взаимодействовать как через продукцию, так и через технологию.

Основные точки соприкосновения между биотехнологией и химической

технологией лежат в области изучения, разработки, проектирования, создания и осуществления процессов микробиологического производства продуктов, качественно превосходящих сырье, из которого они получены.

В случае микробиологических процессов можно предвидеть две возможности взаимоотношений биотехнологии с химической технологией: 1) подход, основанный на биохимической технологии; 2) подход, основанный на физиологии микроорганизмов. Взаимодействие между биотехнологами и химикамитехнологами лучше всего прослеживается на примере производства основных продуктов промышленных микробиологических процессов.

Например, производство витамина С, одна из стадий которого микробиологическая, производство лимонной кислоты и многого другого.

Основная задача практической химической технологии состоит в создании производственных систем, с помощью которых, используя достижения науки и техники, из сырья и материалов можно экономичным путем получать продукты, пользующиеся спросом.

В биотехнологических процессах применяется специальное оборудование для превращения сырья в готовую продукцию с помощью биохимических реакций, фазовых переходов, агломерации, разделения, экстракции, высушивания, концентрирования и т.д. Как видим, используются те же способы и методы, что и в химической технологии. Корни современной прикладной микробиологии и соответственно биотехнологии уходят в химическую промышленность начала нынешнего века: именно тогда были разработаны основы промышленного производства ряда химических веществ (ацетона, этилового спирта, бутадиола, бутанола и изопропанола) из углеводов растений, на смену этой важной отрасли промышленности пришла быстро развивающаяся нефтехимическая промышленность. Однако сейчас запасы ископаемого сырья стали предметом конкуренции, так как оно требуется для производства химических веществ, пищевых продуктов, энергии.

В экологическом плане имеет большое значение получение горючего при переработке загрязняющих среду отходов, объем которых постоянно увеличивается. Эти процессы служат основой для создания безотходного производства, например, в России образуется 250 млн. т отходов животноводства

в пересчете на сухое вещество, переработка только этих отходов может дать 10 – 12 % добычи метана в стране; из 200 млн. т соломы злаковых, получаемых ежегодно, половина не используется в хозяйствах, а это также может дать 3 – 4 % добычи метана.

Помимо этого, сжигание ископаемого топлива приводит к загрязнению окружающей среды и в связи с этим становится актуальным производство экологически чистой энергии. Увеличение количества наземного транспорта приводит к загрязнению атмосферы выхлопными газами, использование же в качестве горючего продуктов, полученных биологическими способами (спирт, биогаз), снижает это загрязнение.

Получение микробиологическим способом некоторых видов горючего, например, спирта – это традиционный, хорошо изученный процесс. Длительную историю имеет и получение биогаза. По мере удорожания нефтяного сырья интерес к микробиологическому производству увеличился. Уже внедрено или находится в стадии разработки большое количество биотехнологических процессов, которые можно использовать для решения энергетической проблемы. Классификация основных направлений дана на рис. 1.6.

Биотехнологические способы получения энергии уже оказали большое влияние на энергетический потенциал многих стран, и развитие этого направления считается очень перспективным.

Освоенный путь получения энергии биотехнологическим путем идет по схеме:

Биомасса или отходы производства ⟶ ферментация ⟶ газообразное или жидкое топливо

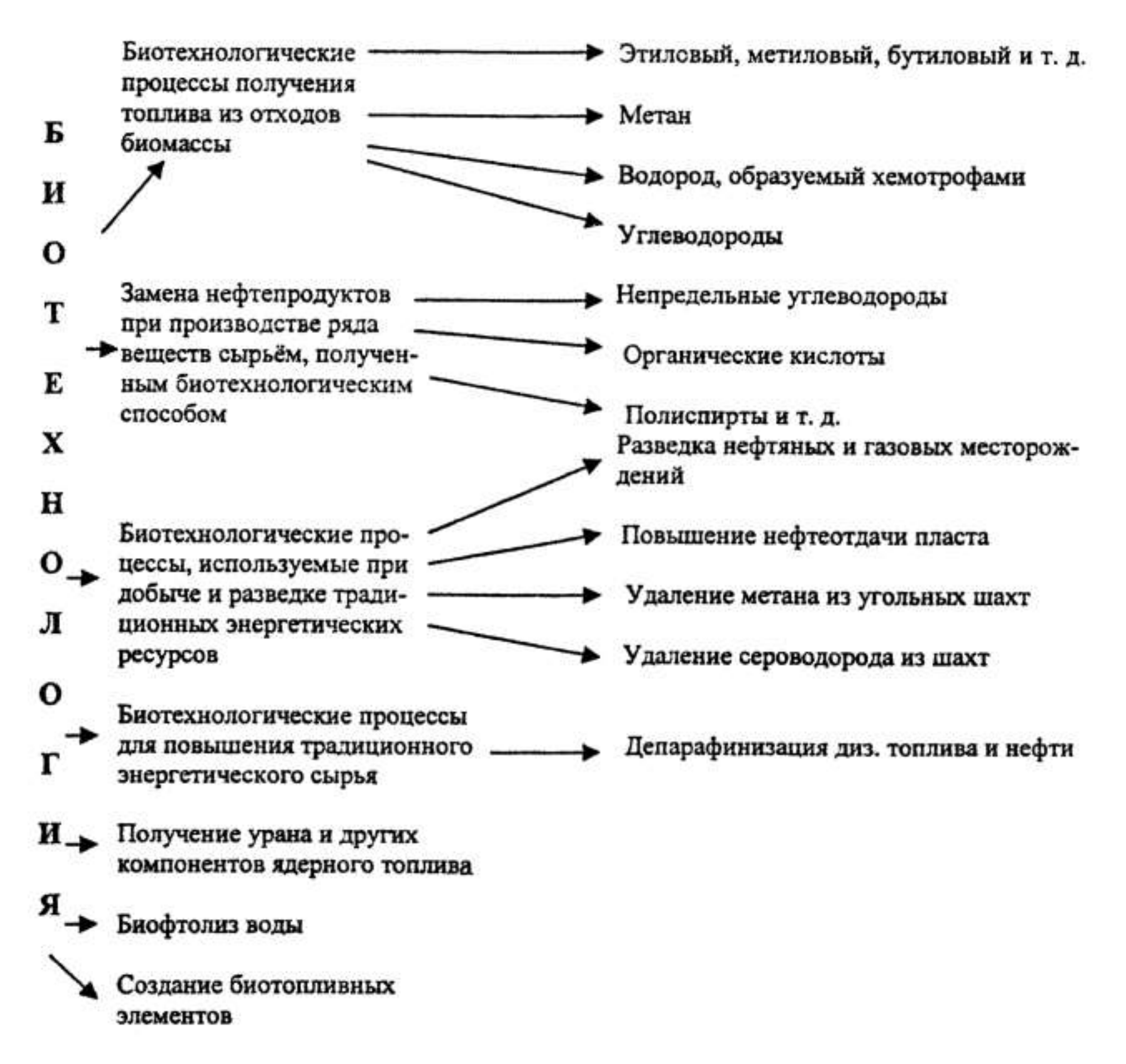


Рисунок 1.6 Классификация биотехнологических процессов применяющихся в решении энергетической проблемы

Наиболее перспективное направление биоэнергетики – биологическая конверсия органических веществ в биогаз, содержащий 50 – 80 % метана и 20 – 50 % углекислого газа. Этому вопросу в последние годы было посвящено много публикаций.

В нашей стране работает рад биоэнергетических установок, где получают метан и удобрения из навоза. Особенно много установок по получению топливного биогаза создано в КНР, где таким методом производится около 80

млн. т условного топлива. Аналогичные установки есть в Западной Европе, Индии и во многих других странах.

Использование биогаза для энергетических целей не ново. С конца прошлого века были известны микроорганизмы, образующие газы в анаэробных условиях; в 1894 – 1899 гг. образование метана изучал академик В.Л. Омелянский. Он показал, что метан, который выделяется при разложении осадков сточных вод, в илах болот, образуется микроорганизмами. Уже в конце прошлого века в Индии испытывали установки, на которых производили метан. В это же время его использовали в Англии для уличного освещения. С 1920 г. производство и применение биогаза началось в Китае.

Перспективное энергетическое сырье – традиционный продукт микробиологической промышленности – этиловый спирт.

Спирт в качестве горючего начали использовать давно. В конце XIX в. его пытались применять для двигателей внутреннего сгорания. Во время экономического кризиса 30-х годов и второй мировой войны спирт применяли в качестве добавок к моторному топливу. В последующие десятилетия интерес к использованию спирта в качестве горючего снизился, а в 70-х годах возрос. В Бразилии уже в течение нескольких десятилетий спирт прибавляют к моторному топливу. В 1982 г. там построен завод, производящий из сахаросодержащего сырья непрерывным способом 150 тыс. л 96 %-го и технического этанола в сутки, а также установка по производству этанола из древесины. В этой стране весь автомобильный транспорт планируется перевести на этиловый спирт. В Японии с 1990 г. снизили долю экспортируемой нефти с 72 до 49 % за счет производства этанола с помощью иммобилизованных дрожжей, В США в 1978 г. еще не было организовано производство топливного спирта, а к 1983–1984 гг. уже производили 400–00 млн. галлонов спирта; сейчас в этой стране пускается одна из крупнейших в мире установок по производству топливного этанола. Использование спирта в качестве моторного топлива начато или планируется начать в Нидерландах, Канаде, Новой Зеландии, во Франции, на Филиппинах, в Индонезии, Малайзии, Индии и в других странах. Эта проблема имеет большое

значение для развивающихся стран, в составе ЮНИДО (организация ООН по промышленному развитию) создан международный центр по вопросам микробиологического производства топливного спирта.

В ряде стран США, Германии, Италии, Финляндии приступают к выпуску автомашин, работающих на 96 %-ном спирте. Но чаще для двигателей машин применяют газоголь (смесь бензина с 10 – 20 % спирта), при использовании которого модификация двигателей не требуется. Добавка спирта к бензину позволяет экономить нефть, меньше загрязнять атмосферу токсичными веществами. При этом улучшается качество топлива – повышается октановое число, что позволяет использовать более дешевые сорта бензина, а также повышается температура самовоспламенения смеси. По данным фирм Бразилии, спирт из сахарного тростника на 40% дешевле самого низкосортного бензина.

Для производства этанола применяются сахаристые и крахмалистые вещества, целлюлоза. В нашей стране традиционно этиловый спирт получают из гидролизатов древесины. Опыт, накопленный за 50 лет существования гидролизной промышленности, может быть использован для получения топливного спирта. В качестве сырья для производства спирта за рубежом часто используют сельскохозяйственные продукты - сорго, пшеницу, маис, кукурузу, маниоку, картофель, сахарную свеклу, сахарный тростник. Повышение в начале 80-х годов цен на зерно снизило интерес к его использованию в качестве сырья для биотехнологических производств. По-прежнему, безусловно, рационально осуществлять процесс на отходах промышленности и сельского хозяйства, городских отходах.

Много работ появилось по утилизации целлюлозы, лигноцеллюлозы для производства этанола. Получение этанола из целлюлозосодержащего сырья осуществляется по следующей схеме: целлюлоза (химический или ферментный гидролиз) – спирт; моносахариды (микробиологическая конверсия) – спирт. Механизм процесса сложен, в настоящее время он детально изучен. Как и при использовании этого сырья для производства белоксодержащей биомассы, наряду с усовершенствованием способов гидролиза целлюлозы важна разработка

методов ферментативного гидролиза. Проводятся исследования в направлении подбора микроорганизмов и получения мутантов, производящих целлюлозу, гидролизующих целлюлозу до глюкозы или целлобиозы. Может быть осуществлено и прямое сбраживание целлюлозы в этанол, например, целлюлозолитическими споровыми бактериями.

В качестве заменителей нефти могут быть также использованы полученные биотехнологическим способом бутанол, метанол, жидкие углеводороды, глицерин и т.д.

Для разработки эффектных способов получения биогаза, жидких топлив большое значение имеет выделение и получение методами генетической инженерии штаммов-продуцентов, использование иммобилизованных установок, использование солнечной энергии для процессов ферментации, разработка физико-химических методов извлечения продукта, ингибирующего процесс в биореакторе (например, этанола), в частности, использование полупроницаемых пористых мембран для выделения спирта из ферментационной среды и т.д. Интересная тенденция – замена аэробных процессов анаэробными, т.к. последние более просты, менее энергоемки и более экономичны.

Важно проведение работ по механизации технологии сбора и транспортировки сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов, по усовершенствованию стадии подготовки для осуществления его биологической трансформации в источники энергии проводятся работы по биотехнологическому ферментативному превращению свекловичного жома – отхода свеклосахарного производства, в моторное топливо – этанол.

Была получена и выделена культура микроорганизмов – мутантный штамм на основе иммобилизации целлюлозоразлагающих микроорганизмов и диких дрожжей, способных клетчатку жома одновременно осахаривать и сбраживать в этанол. В настоящее время проводится отработка технологии процесса для внедрения в промышленность.

1.7. Перспективы развития промышленных биотехнологических процессов

Велика роль биотехнологии в переработке твердых отходов городов,

животноводческих хозяйств. Отходы крупных животноводческих комплексов по объему могут быть эквивалентны городу с 1 млн. населения. Ежегодный прирост мусора и отходов городских поселений в западноевропейских странах достиг 2,5 %, в США 4 %, в Украине 1,5 %. В городах США на одного человека в год приходится до 1 т твердых отходов, а в Западной Европе – 200 кг.

Для переработки твердых отходов (городских) применяется компостирование, при котором происходит микробиологическая деградация твердых органических материалов, в результате образуется стабилизированный продукт – компост. Поскольку в этих отходах могут содержаться личинки, семена сорняков, яйца гельминтов и патогенные микроорганизмы, некоторые из которых могут жить более 100 дней, то важно, чтобы компостирование проходило через термофильную стадию при которой убивается вся эта флора. При компостировании увеличивается плотность материала. Процессы компостирования можно осуществлять периодическим или непрерывным способом в специальных аппаратах с аэрацией и перемешиванием компостируемой массы. Непрерывный процесс обеспечивает высокую скорость разложения субстрата, но капиталовложения при этом повышаются по сравнению с периодическим компостированием.

Разрабатываются специальные методы деструкции трудно разлагаемых промышленных твердых отходов. Например, австрийский бактериолог Г. Шаден выделил бактерии, разлагающие пластмассу. В Болгарии, США и других странах разработаны способы микробиологического разрушения автомобильных шин. Исследования ведутся и в направлении изысканий новых способов получения искусственных материалов с пониженной стойкостью к микробиологической деградации. Например, разработаны способы получения полимеров с повышенной скоростью биораспада. Это достигается путем введения в полимеры различных добавок.

Биологические способы дают возможность не только обезвредить, но и утилизировать отходы. Стимулом для развития промышленности по получению кормового белка во многих странах было введение ограничений на сброс отходов

бумажных фабрик. При обработке этих отходов на них начали выращивать кормовые дрожжи. В России широко применялись также гидролизаты отходов сельского хозяйства, отходы пищевой промышленности, бродильных производств и т.д. Сточные воды, содержащие вещества, аккумуляция которых нежелательна в кормовом продукте, могут служить сырьем для получения микробиологическим способом технического белка, бактериальных препаратов, применяемых для защиты растений, производства удобрений, промышленных спиртов, органических кислот, ферментов и других веществ. При очистке сточных вод, содержащих сульфаты, во время второй мировой войны получали серу из сероводорода, образуемого сульфат-редуцирующими бактериями. Большое значение имеет разработка биологических методов извлечения металла из сточных вод, так как потери этого невозобновляемого сырья очень велики. Получаемый при биологической переработке твердых отходов компост может быть использован в качестве удобрения, а биогаз, образуемый при аэробных процессах – ценное энергетическое сырье. Многообещающей областью дальнейшего развития биотехнологии представляется производство ценных веществ из растений.

Растения издавна являются поставщиками химических соединений для самых различных отраслей химической промышленности. Это не только такое сырье, как сахара, но и целый набор сложных вторичных метаболитов, например, каучук, кокаин, вещества, использующиеся в качестве красителей, вкусовых добавок и пряностей. Получить такие вещества методом химического синтеза часто бывает невозможно из-за сложности их строения. Сегодня воодушевленные успехами биотехнологии ученые вновь обращаются к царству растений. Они не только пытаются отыскать пути улучшения способов выработки уже освоенной продукции (например, аймалина и колеина), но и разработать новые принципы биотрансформации и получить новые продукты. Предстоит в ближайшие годы заставить гены растений работать в бактериальных клетках; сложность этой задачи состоит в том, что мы плохо знаем, как они работают даже в собственных клетках. Кроме того, вторичные метаболиты образуются в результате

многоступенчатых процессов, о регуляции которых нам тоже почти ничего не известно. Можно думать, что путем использования культур растительных тканей можно разработать новые подходы к получению ценных химических продуктов, особенно лекарственных веществ, а также улучшить сорта растений. Работая с культурами тканей растений, можно контролировать образование таких веществ и при этом не зависеть от капризов погоды и не думать о вредителях растений, которые так сильно влияют на образование нужных веществ. Культуры растительных тканей можно получить из любого вида растений. При этом используются разнообразные среды. Познание особенностей физиологии и биохимии таких культур позволило значительно повысить их урожайность и выход биомассы. Однако многие такие культуры не могут считаться истинными автотрофами, так как для роста им необходимы внешние источники углерода (в форме глюкозы или сахарозы), азот, минеральные вещества и факторы роста. Сегодня мы умеем получать большее количество биомассы (20 – 30 г/л), но повысить выход интересующих нас веществ обычно удается лишь за счет снижения выхода биомассы и подавления роста. Выход различных веществ в культуре может быть в 10 раз выше, чем в случае растения, но для этого необходимо разработать новые стратегии скрининга и селекции, особенно, если искомый продукт образуется в малых количествах.

В будущем влияние биотехнологии на развитие химической технологии будет определяться возможностью объединения принципов микробиологии, биохимии и химической технологии.

Наиболее перспективными областями применения биотехнологии можно назвать следующие:

Тип реакции: прямые реакции окисления – восстановления; использование обычных ферментов для проведения нетривиальных реакций; белковая инженерия, нацеленная на изменение свойств катализатора, использование биокатализа в неводных средах.

Конфигурация реактора: оптимизация биокатализаторов методами генной инженерии; выбор термостабильных систем или использование

иммобилизованных конфигураций, разработка дешевых, эффективных и общеудобных методовповторного использования кофактора; химическая инженерия в связи с проблемами крупномасштабных биокаталитических систем.

1.8 Биологическая переработка отходов

1.8.1 Анаэробное сбраживание и метаногенерация

Анаэробное сбраживание и метаногенерацию применяют для переработки, обезвреживания и уменьшения объемов биомассы различного происхождения, отходов животноводческих и птицеферм, осадков очистных сооружений, бытовых отходов, целлюлозо-, белок-, жиросодержащих и других материалов с большим содержанием органических веществ. Органическое вещество минерализуется в процессе метаногенерации с образованием биогаза. Образующийся биогаз может быть утилизирован на энергетические и тепловые нужды.

При переработке 1 кг ТБО образуется до 20 л биогаза в сутки, а ТБО города с населением 150 000 человек – до 2 млн м^3 биогаза в год.

При метаногенной переработке навоза используется понятие «животной единицы». Одной животной единице условно соответствуют: 1 взрослая корова, или 5 телят, или 6 свиней или 250 куриц. Одна животная единица способна производить в сутки 1,5 м^3 биогаза. Из 1 т сухого вещества навоза при оптимальных условиях можно получить 350 м^3 биогаза, или в пересчете на 1 голову КРС в сутки 2,5 м^3, а в течение года около 900 м^3, что эквивалентно по теплотворной способности 600 – 700 л бензина. При переработке отходов хозяйств с 550 тыс. голов крупного рогатого скота можно получить в сутки 2480 тыс. м^3 биогаза, а с 400 тыс. голов свиней – 900 тыс. м^3 биогаза. Часть вещества, не поддающаяся биологическому разрушению (несброженный твердый осадок), может быть в дальнейшем захоронена или утилизирована. Осадок, образующийся, например, при сбраживании навоза или активного ила, содержит большое количество азота и фосфора, не содержит условно-патогенной микрофлоры и жизнеспособных семян сорняков (при термофильном сбраживании), пригоден для аэробного компостирования или непосредственного использования в качестве удобрения в сельском хозяйстве, а в ряде случаев в качестве источника кормового

витамина B_{12}.

В Китае, Индии, Корее, Тайване, Таиланде, США, Канаде, Японии, Дании и других странах анаэробное сбраживание отходов в биогаз широко используется. Семейные биогазовые реакторы, большие и средние биогазовые электростанции перерабатывают органические отходы городов, отходы животноводства и птицеводства, винных заводов с получением электроэнергии. Биогазовая продукция в Китае оценивается в $33 \cdot 10^{15}$ Дж.

Сбраживание твердых отходов может проводиться как при пониженных, так и при повышенных температурах, но наиболее распространено мезофильное сбраживание. Переработка в метантенках осадков сточных вод и навоза в мезофильном режиме длится около 30 сут., в термофильном − около 5 − 10 сут. при нагрузке по сбраживаемому сырью от 0,5 кг/м^{3}сут. до 5 – 6 кг/м^{3}сут. Сбраживание соломы с влажностью около 60 % при температуре 35 °С происходит на 90 % за 120 – 200 сут., при 55 °С – за 60 – 90 сут.

Для очистки 54 м^3/сут. навозных стоков, поступающих со свинофермы на 1000 голов свиней, с содержанием 5 – 6 % твердых частиц требуется биореактор объемом 570 м^3 при нагрузке 3,5 кг/м^3·сут. и времени пребывания 10 сут. Содержание метана в биогазе 69 %. Концентрация органического вещества в поступающем в реактор сырье должна составлять не менее 2 %. При меньших концентрациях содержание бактериальных клеток резко падает, и процесс практически останавливается.

Ферма КРС на 1000 голов при нормальном кормлении и добавлении в подстилку не менее 4 кг соломы в сутки/голову производит 30 – 50 т отходов влажностью − 85 %. Для переработки этого количества отходов методом твердофазной ферментации требуется реактор общим объемом 1200 м^3, или методом жидкофазной ферментации – 2400 м^3. В сутки, образуется 2000 м^3 горючего газа из которых ~ 600 м^3 потребляется на нужды установки и 1400 м^3 может использоваться для удовлетворения потребности в энергии 1000 домохозяйств по 4 человека в каждом.

В методе термического гидролиза (рис. 1.7) органическая часть отходов

сначала разрушается до короткоцепочечных, более биодоступных фрагментов при повышенных давлении и температуре в реакторе-гидролизаторе.

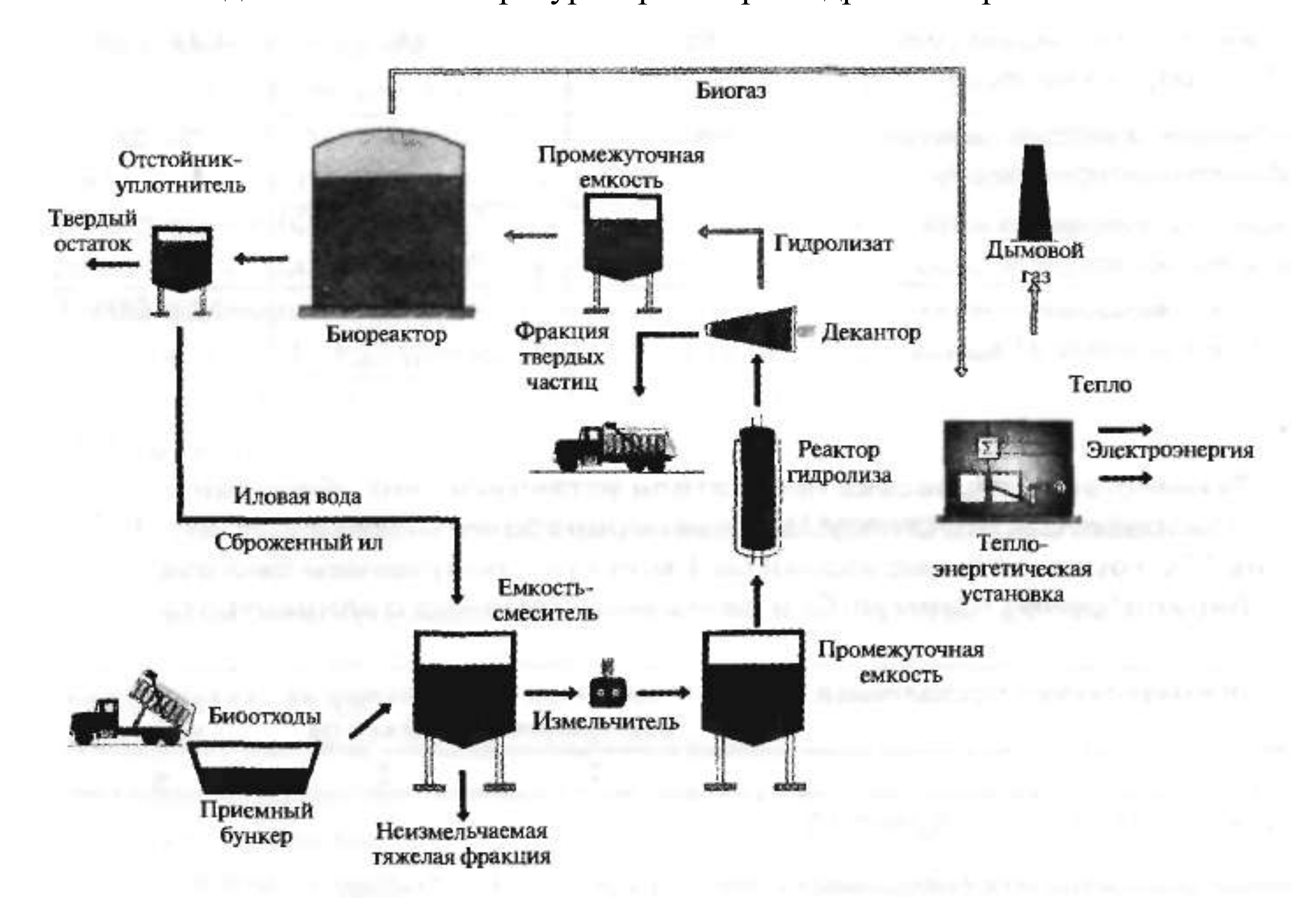


Рис. 1.7 Схема процесса анаэробной переработки отходов с термической предобработкой

Предобработка проводится при температуре до 250 °С и давлении до 5 МПа, что гарантирует полное обезвреживание отходов. Пищевые отходы обрабатываются при температуре около 130 °С и давлении 0,3 МПа. После отделения твердого материала жидкая фаза сбраживается в анаэробном биореакторе. Образованный биогаз направляется в теплоэнергетическую установку для выработки электроэнергии и нагрева реактора. Такая предобработка отходов значительно ускоряет их последующее сбраживание. Жидкий гидролизат может быть полностью сброжен примерно за 5 сут., что позволяет уменьшить объем биореактора до 75 % по сравнению с традиционным методом. Новообразованный анаэробный ил может поступать снова в реактор гидролиза, что повышает выход биогаза. Твердый остаток со стадии термического

гидролиза может быть переработан компостированием или, при высоком содержании тяжелых металлов, обезврежен сжиганием.

В методе двухстадийной анаэробной переработки в отдельных реакторах на первой стадии осуществляется кислотное брожение (гидролиз, ацидогенез, ацетогенез), а на второй – метанообразование. Такое разделение обеспечивает оптимальные условия для протекания каждой из стадий и повышение суммарной скорости процесса.

Биоконверсия в тепловую энергию и топливо

Биоконверсия в тепловую энергию и топливо – один из путей пополнения энергетических ресурсов на основе возобновляемого растительного сырья и органических отходов.

Запасы энергии, связываемые биомассой растений ежегодно, сопоставимы с суммарными запасами энергии нефти, природного газа, угля и урана. Прямое сжигание биомассы позволяет непосредственно вырабатывать тепло и энергию для различных целей. В большинстве стран мира этим способом производится до 10 % энергии, а в некоторых – до 25 – 30 %. Однако такой энергетический источник имеет ряд существенных недостатков: низкую теплотворную способность из-за высокого содержания в своем составе кислорода и влаги (теплота сгорания целлюлозы в 2 раза ниже, чем этанола, и в 3,5 раза ниже, чем метана), сложности со сбором и вывозом в места переработки, часто сезонный характер продукции, зависимость от климатических факторов, загрязнение воздуха дымом печей. Интенсивная вырубка леса при относительно медленном естественном возобновлении запасов биомассы или специальном возделывании монокультур с целью последующего сжигания нарушает сложившиеся ценозы и затрудняет увеличение доли биомассы в суммарно вырабатываемой энергии.

Тем не менее роль биомассы как возобновляемого топлива возрастает в связи с разработками новых, более эффективных технологий сжигания и конверсии, решения проблемы поддержания глобального баланса CO_2 в атмосфере. При сжигании биомассы выделяется столько же CO_2, сколько потребляется его в ходе фотосинтеза.

В качестве источников биомассы для выработки топлива в ряде стран, особенно в странах тропического пояса, выращивают, в частности, высокоурожайные сорта древесных растений (эвкалипт, иву, тополь и др.), сахарный тростник, кукурузу, рапс, водяной гиацинт. Например: с 1 га, плантации эвкалипта, используемого для получения биоэтанола, можно получить до 10 – 30 т биомассы в год.

Не менее важный и экологически более рациональный источник энергии и топлива – отходы городского и сельского хозяйства, промышленности: навоз, активный ил, бытовой мусор, багасса, меласса, побочные продукты производства бумаги и целлюлозы, солома, шелуха и т. п.

Энергетическая эффективность и ценность биомассы как источника топлива может быть повышена методами биологической, термической и термохимической конверсии (рис. 1.8).

Один из вариантов повышения качества биомассы как топлива – переработка ее в гранулы, пеллеты, брикеты, которые можно получать как из древесины, так и из различных органических отходов путем обработки паром под давлением. По теплотворной способности такие гранулы занимают промежуточное положение между бурым и каменным углем, удобны в транспортировке, использовании. При их сжигании, в отличие от угля, остается намного меньше золы, и выбросы оксидов серы незначительны.

Некоторые компоненты топлива можно непосредственно выделять из растений и одноклеточных организмов, накапливающих их в больших количествах. Например, существуют растения, синтезирующие и накапливающие в своей массе 10 % и более углеводородов (каучуконосы, латексобразующие растения семейства молочайных). Латекс представляет собой 30 %-ю эмульсию масла и терпеновых углеводородов с молекулярной массой 10 – 20 тыс., в то время как у каучука она составляет 1 – 2 млн.

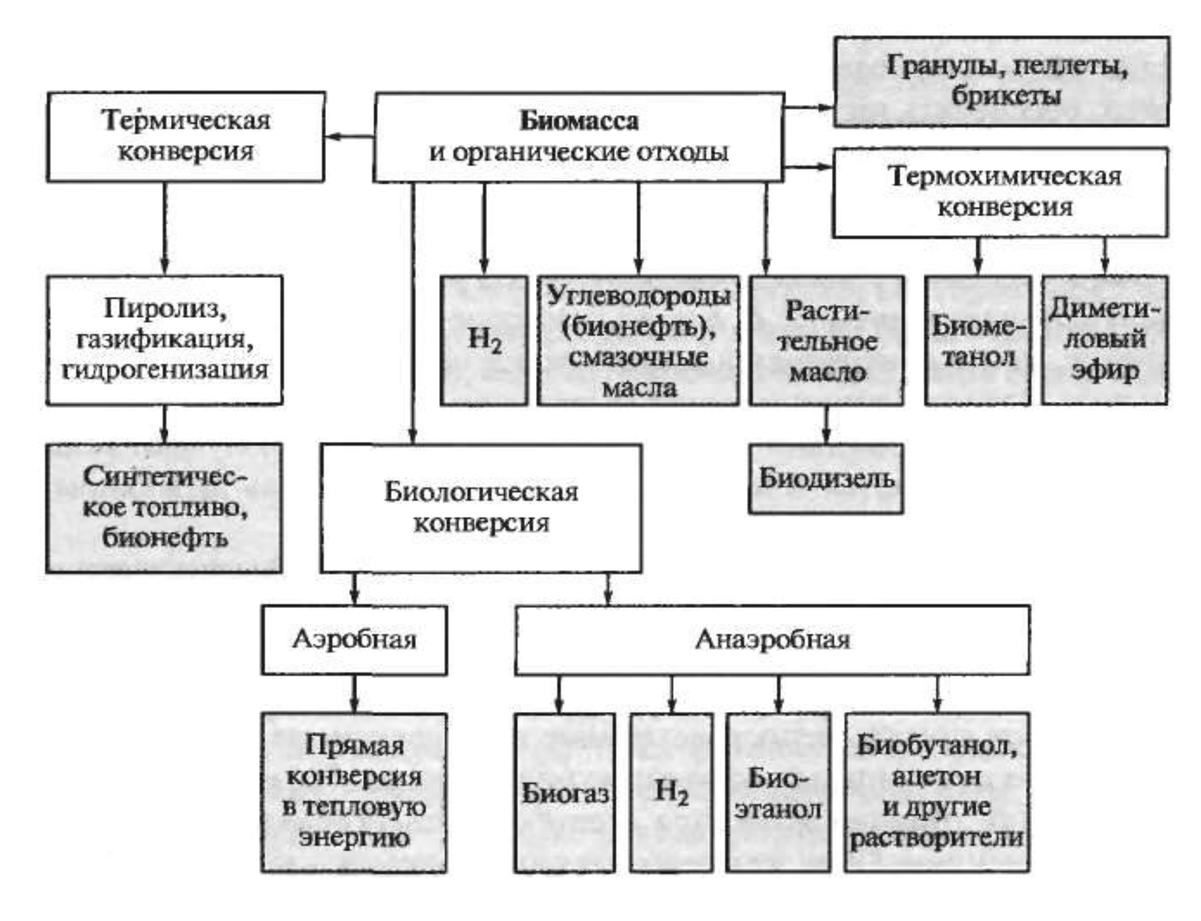


Рис. 1.8. Варианты конверсии биомассы в тепловую энергию и топливо

1.8.2 Компостирование

Компостирование – экзотермический процесс биологического окисления, в котором органический субстрат подвергается аэробной биодеградации смешанной популяцией микроорганизмов в условиях повышенной температуры и влажности.

В процессе биодеградации под действием естественной микрофлоры – мезофильных и термофильных бактерий – окисляется до 60 % органического вещества, оставшийся органический субстрат претерпевает физические и химические превращения, сопровождающиеся образованием гумифицированного конечного продукта. В ходе компостирования перерабатываемый материал разогревается до температуры 60 – 80 °С, при которой погибают личинки и куколки насекомых, нематоды, яйца гельминтов и болезнетворные неспорообразующие микроорганизмы, семена сорных растений. Полученный компост представляет собой сыпучий материал меньшего объема, чем исходный, влажностью 40 – 50%,

стабилизированный по биологическим показателям и претерпевающий лишь медленное разложение.

С помощью компостирования различные малотоксичные, но загрязняющие окружающую среду органические отходы перерабатываются в более стабильные и/или менее токсичные материалы, лишенные неприятного запаха. Как способ переработки вредных отходов и уменьшения содержания загрязнений компостирование в настоящее время применяют для утилизации и обеззараживания активного ила и осадков очистных сооружений, навоза, помета, переработки твердых бытовых отходов после их предварительной сортировки, для очистки почв и других материалов, загрязненных нефтью, пестицидами, полициклическими араматическими углеводородами (ПАУ), полихлорированными бифени-лами (ПХБ) и другими органическими поллютантами.

Компостированием получают ценные для сельского хозяйства органические удобрения и средства, улучшающие структуру почвы. Компосты могут использо-ваться для выращивания грибов, в качестве основного удобрения на огородах, садовых участках и т. д. Компостирование экономичный и рентабельный способ получения энергии из сельскохозяйственных отходов. Тепло, выделяемое при компостировании, можно утилизировать для нагрева воздуха и воды до 50 – 55 °С и отопления парников.

Компостирование различных отходов в промышленных масштабах наиболее широко применяется в странах Европы и США. На нескольких мусороперерабатывающих заводах твердые бытовые отходы компостируют вместе с осадками сточных вод, при этом из 1 млн т отходов получают в среднем 360 тыс. т компостов. Затраты на получение таких компостов относительно велики, поскольку ТБО, поступающие на переработку, или уже готовый компост требуется сортировать. Имеется опыт и крупномасштабного полевого компостирования отходов животноводческих ферм.

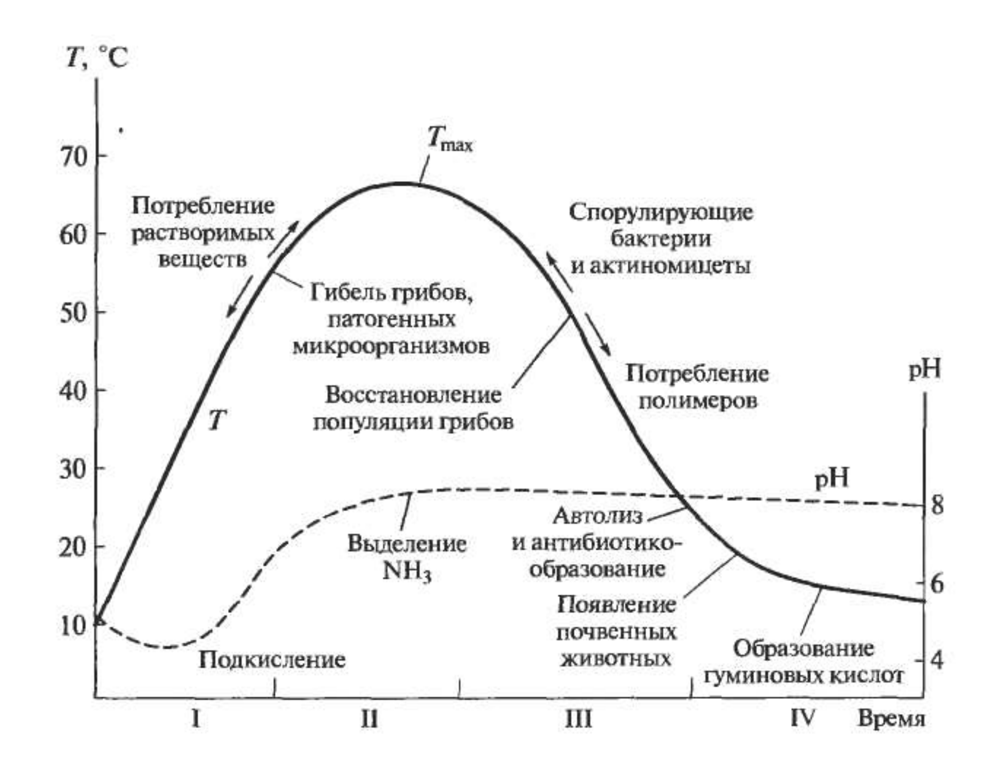


Рис. 1.9 Стадии компостирования

Выделяют 4 стадии компостирования: I – мезофильную, II – термофильную, III – остывание, IV – созревание. Продолжительность стадий I–III – несколько суток и недель, стадии IV – несколько месяцев.

На первой стадии начинают развиваться мезофильные микроорганизмы. В результате протекания аэробных процессов окисления органического субстрата тепла выделяется намного больше, чем в ходе анаэробных процессов (в частности, при силосовании), температура внутри компостируемой смеси начинает постепенно повышаться с 10 – 15 °С до 30 – 45 °С. При достижении температуры 40 – 45 °С наступает вторая стадия компостирования. На последующей стадии, после потребления легко разлагаемого субстрата, скорость окисления начинает падать по мере того, как в него вовлекаются более устойчивые субстраты; температура внутри компостируемой массы понижается, рН медленно убывает, но остается щелочным. По мере остывания сначала восстанавливаются популяции спорообразующих бактерий и бактерий-актиномицетов, затем грибов. На заключительной стадии, созревания, дефицит питательных веществ и смена доминирующей микрофлоры приводят к лизису

части микробных клеток, появляются почвенные животные. Оставшиеся органические вещества вовлекаются в сложные реакции между остатками растительных полимеров и продуктами разложения, приводящие к образованию гуминовых кислот.

Наиболее благоприятные условия для разогревания субстрата создаются в рыхлых увлажненных кучах. Тепло, выделяемое в больших кучах, может нагреть массу до 80 – 90 °С. Протекающие при этом химические реакции могут привести к обугливанию и даже возгоранию массы.

Компостирование проводят в буртах, грядах, кучах, штабелях на открытых площадках (полевое компостирование), ямах, траншеях с изолированным дном или в специальных емкостях. Длительность компостирования в таких системах зависит от ряда условий: климатических, вида перерабатываемых материалов, степени измельчения и продолжительности хранения компостной массы, влажности, условий аэрации.

Для компостирования важно оптимальное соотношение углерода, азота и фосфора в закладываемой массе. Соотношение углерода к азоту должно находиться в пределах 20:1 – 30:1. Содержание фосфора должно составлять 0,5 – 1,0 % от СВ компоста.

Примерные соотношения C:N в компостируемых органических отходах:

– мочевина	0,43
– трава, сорняки	20
– высушенная кровь	3
– твердые отбросы	35
– нечистоты, фекалии	8
– листья	60
– сырой активный ил	8
– пшеничная солома	80
– костная мука	8
– рисовая солома	100
– навоз	14

− сырые древесные опилки 500

− отходы пивоварения 15

− бумага >1000

− водяной гиацинт 16

Смешивают, например, активный ил с ТБО, шлам сточных вод или куриный помет с корой, навоз или птичий помет с торфом в соотношении от 1:1 до 1:3, осадки сточных вод, ТБО, гидролизный лигнин, торф, сельскохозяйственные отходы и т. д.

Размеры компостных куч, гряд, штабелей, буртов должны обеспечивать необходимую влажность, температуру и аэрацию внутри компостируемой массы. При высоте менее 1,5 м компостная масса быстро подсыхает, потери тепла существенны, температурный режим биодеградации нарушается. Все это ухудшает компостирование. При высоте компостного ряда более 3 – 4 м происходит нарушение естественной аэрации, продолжительность компостирования увеличивается, возрастает содержание промежуточных низкомолекулярных веществ биодеградации, качество компоста падает.

В больших кучах температура может достигать 80 – 90 °С. Слишком высокая температура внутри разогреваемой кучи подавляет рост микроорганизмов: очень немногие виды сохраняют активность при $T > 70$ °С; скорости биологических процессов и последующего созревания компоста падают. Однако температура свыше 55 – 60 °С полезна для борьбы с термочувствительными патогенными микроорганизмами. Поэтому оптимальной является температура 55 – 65 °С, при которой, с одной стороны, гибнет патогенная микрофлора, а с другой – развивается микрофлора, ответственная за деградацию биополимеров. Для поддержания оптимальной температуры организуют испарительное охлаждение с помощью принудительной аэрации.

Аэрация необходима для биоокисления органических веществ, удаления CO_2, H_2O и теплоты. Естественная аэрация не позволяет создать оптимальные условия для компостирования: время компостирования увеличивается, вследствие чего снижается качество компоста. В таких случаях компостную массу необходимо

периодически рыхлить.

По окончании компостирования степень переработки органического вещества составляет 40 – 60 %, влажность массы снижается до 25 – 50 %, зольность повышается до 20 – 75 % и существенно уменьшается ее объем.

Типичный состав компоста (% по сухой массе):

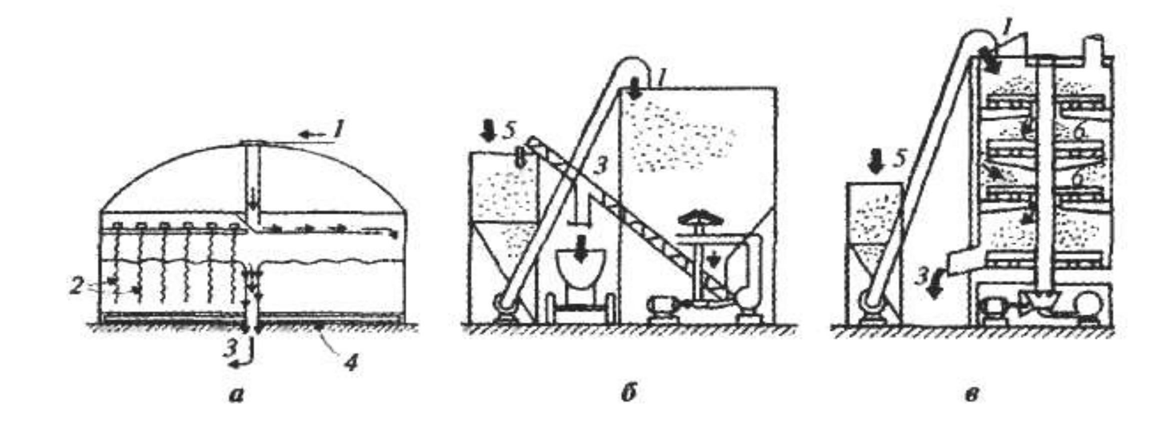
− органические вещества 25 – 80
− С 8 − 50
− N 0,4 − 3,5
− Р 0,1 − 1,6
− К 0,4 − 1,6
− Са (в виде СаО) 0,7 − 1,5
− рН компоста 6,5 – 7,5.

Необходимо контролировать уровень тяжелых металлов в компосте.

Компост можно вносить в почву в качестве удобрений каждые 3 – 4 года (если содержание тяжелых металлов в нем не превышает норму). Типичные нормы внесения компоста – 5 – 10 т/га по сухому веществу.

Механизированным компостированием на специализированных установках в биоконвекторах, биореакторах, ферментационных барабанах, силосах, биотуннелях, траншеях и т. п. достигается наиболее высокая производительность обработки, при этом продолжительность компостирования можно уменьшить до 2 – 3 недель и даже до 2 – 7 суток. Объемы биореакторов для компостирования достигают 100 – 500 м^3, производительность – от 0,5 до 300 т компоста в сутки.

В вертикальных реакторах типа силосных башен с одноступенчатым и многоступенчатым (многоэтажным) циклом (рис. 1.10) компостирование проводится с перемешиванием материала внутри реактора либо без перемешивания при продолжительности от 3 до 21 сут. в зависимости от типа реактора и технологического процесса. При этом обычно для ускорения процесса к компостируемому материалу добавляют часть (до 1/3) готового компоста. Компостируемая масса загружается сверху и выгружается снизу.



а – с перемешиванием внутри реактора; б – с одноступенчатым циклом; в – с многоступенчатым многоэтажным циклом;
1 − подача компостной смеси; 2 − смесительные устройства; 3 − выгрузка компоста; 4 − система аэрации воздухом; 5 − смеситель; 6 – поды
Рис. 1.10 Устройство вертикальных биореакторов для компостирования

Воздух для аэрации компримируется в нижнюю часть реакторов и откачивается из верхней части.

На рис. 1.11 представлен один из вариантов механизированной системы совместного компостирования твердых городских отходов и осадков сточных вод. На первой стадии такой переработки ручной сортировкой удаляются стекло, цветные металлы, крупный металлолом, стройматериалы и другие некомпостируемые отходы. Жестяная тара и мелкий лом черных металлов удаляются электромагнитной сепарацией. Оставшаяся масса измельчается до размера не более 2,4 мм и смешивается с осадком сточных вод. Смесь компостируется в течение 6 сут., затем перемалывается и высушивается.

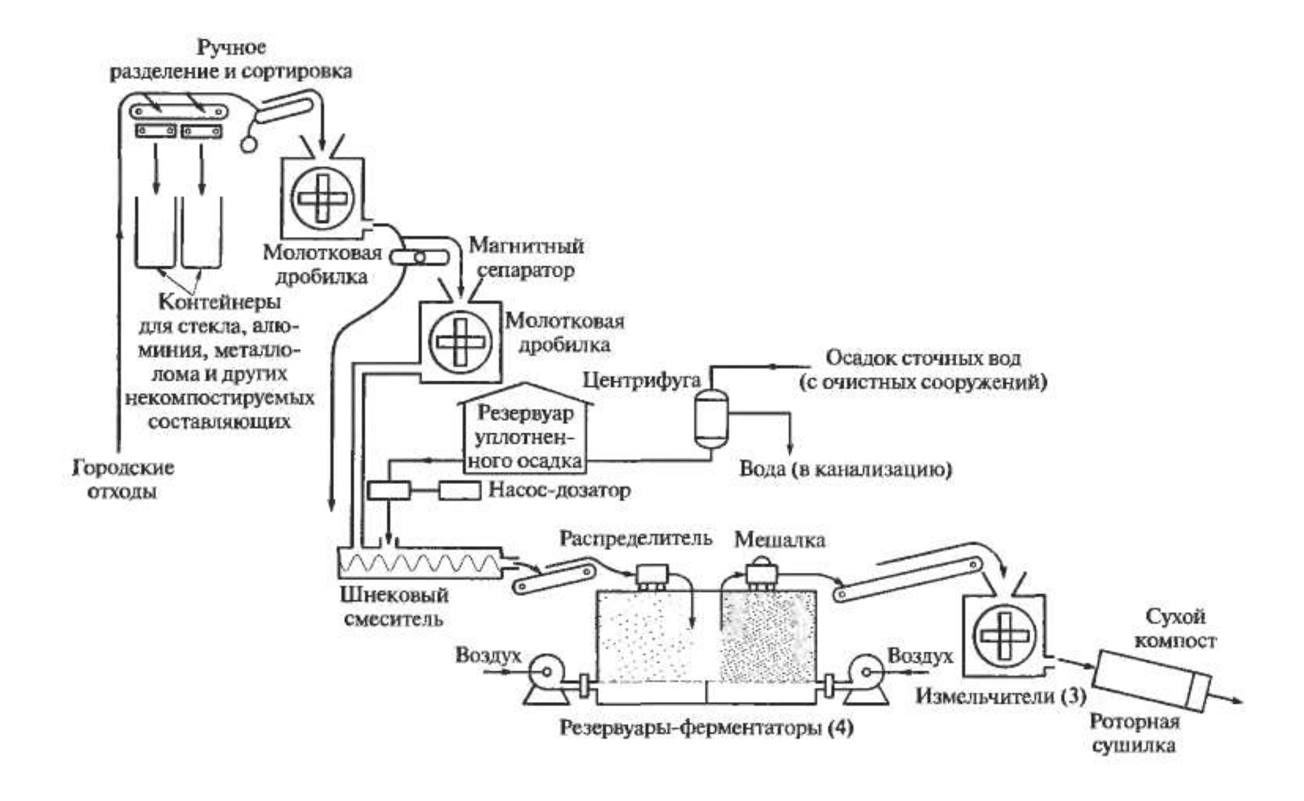


Рис. 1.11 Схема системы компостирования твердых городских отходов и осадка сточных вод

1.8.3 Вермикультивирование и вермикомпостирование

Процессы переработки твердых органических отходов и субстратов с помощью культуры дождевых червей, использующих органические вещества в качестве источника питания, называются вермикультивирование и вермикомпостирование (от латинского – червь). При переработке отходов этими методами-конечными продуктами являются биогумус (органическое удобрение) и биомасса дождевых червей.

Вермикультивирование в большей степени ориентировано на получение массы дождевых червей с целью их последующего использования в качестве кормовой добавки в рационах питания птиц и свиней, в фармацевтике, а также в технологиях обезвреживания почвенных загрязнений, восстановления почв и повышения их плодородия. Метод биоремедиации, при котором используется способность земляных червей и других представителей почвенной мезофауны разрыхлять почву, облегчая тем самым дренаж воды и проникновение газов,

называется биорыхлением.

Основные цели вермикомпостирования – переработка органических субстратов для получения удобрительных компостов (биогумуса) и восстановления плодородия почв, обезвреживание бытовых отходов, осадков сточных вод, других отходов, трудно поддающихся утилизации.

Дождевые (земляные) черви стали объектом пристального научного внимания и практической деятельности в области земледелия, кормопроизводства и экологии благодаря своим уникальным свойствам: неприхотливости к условиям питания и содержания, быстрому приросту биомассы и высокому содержанию белков в их теле. Они рассматриваются в настоящее время как одно из приоритетных средств ведения «биологического земледелия» и экологически чистого сельскохозяйственного производства, переработки различных органических отходов.

Дождевые черви использовались еще со времен Древнего Египта – ими обрабатывали наносный ил Нила для выращивания сельскохозяйственных культур. В XIX в. червей стали использовать и для утилизации отходов растительного происхождения.

Современный этап изучения дождевых червей, их промышленного получения и использования начался с зарубежных исследований в 40 – 50-х гг. XX в., когда было доказано увеличение урожаев сельскохозяйственных культур (хлебных злаков и др.) с помощью червей.

В бывшем СССР первые опыты по влиянию дождевых червей на урожай стали проводиться в 70-е гг. Было показано, что внесение дождевых червей в почву резко (в несколько раз) повышает урожайность таких сельскохозяйственных культур как ячмень и клевер.

В настоящее время во многих странах созданы и успешно развиваются десятки тысяч коммерческих хозяйств и около 1000 крупных биофабрик по выращиванию червей и получению биокомпостов, поставляющие предпринимателям маточную культуру червей и оборудование. Наибольшее распространение вермикультивирование и вермикомпостирование получило в

США, Канаде, Китае, Индии, Южной Корее, Австралии, Италии, Мексике, на Кубе.

В результате многочисленных научных исследований и практических работ были выяснены свойства биомассы получаемых червей, условия их разведения, переработки различных отходов.

Особенности дождевых червей как биологических объектов культивирования

Дождевые черви – это беспозвоночные животные, относящиеся к числу древнейших обитателей Земли. Их возраст насчитывает 600 млн лет. Название «дождевые черви» сборное, применяемое ко всем более или менее крупным представителям пяти различных семейств типа кольчатые черви, класса олигохет, обитающих в почве. Важнейшей особенностью строения олигохет является правильная повторяемость отдельных сегментов (колец) вдоль оси червеобразного тела животного. При размножении дождевые черви откладывают яйца в кокон.

При внешнем сходстве между собой семейства дождевых червей различают, главным образом, по особенностям строения внутренних органов, в частности, органов размножения, по расположению пояска, щетинок и другим признакам.

Всего по различным данным на Земле обитает от 3 до 8 тыс. видов дождевых червей.

Питаются черви мертвыми разлагающимися растительными тканями, поступающими в почву в виде опада, корневых и пожнивных остатков, а также и животными остатками. Вместе с ними они заглатывают и различных представителей почвенной микрофлоры: бактерии, водоросли, грибы и их споры, простейших и нематод. Некоторые из видов дождевых червей являются типичными потребителями гумуса и предпочитают верхний слой почвы (гумусопотре-бители, эпигейные черви), другие обитают в средних слоях почвы, а некоторые живут на глубине до 2 м. Виды и популяции червей, встречающиеся в навозе и других негумифицированных органических субстратах – гумусообразующие.

Окраска червей различная. К родам с красной окраской принадлежат

Lumbricus, Dendrobaena и Eisenia, которые обитают преимущественно в подстилке и верхних, богатых гумусом горизонтах; представители родов Allolobophora, Octolasium и Eiseniella имеют окраску от серой до зеленоватой.

Биомасса дождевых червей в почве составляет 50 – 72 % от всей биомассы почвенной мезофауны. В естественных местах обитания дождевых червей (луга, пастбища, пашни) общее их количество в почве может достигать 10^6 – 10^7 особей/га, а вес биомассы 10^3 – 10^4 кг/га.

Оптимальные условия жизнедеятельности дождевых червей

Питание. При недостаточном питании рост и развитие червей сильно замедляется, они гибнут. Дождевые черви нуждаются, прежде всего, в азотсодержащей органике, запасы которой в почве ограниченны, поэтому наибольшая численность, темпы индивидуального роста и плодовитость червей обычно наблюдаются в местах локализации органического субстрата, богатого азотом (на пастбищах, вблизи экскрементов травоядных животных и т. п.). Азот, содержащийся в почвенной микрофлоре и микрофауне, заглатываемой и перевариваемой червями, почти полностью ими усваивается. Оптимальное отношение C:N в органическом субстрате должно быть близкое к 20. Кроме азотсодержащих веществ (белков, аминокислот) перерабатываемые органические материалы должны содержать углеводы, разнообразные минеральные вещества, витамины, а также клетчатку или другие вещества, отсутствие которых затрудняет пищеварение. В их составе также должны присутствовать минеральный инертный наполнитель, песок или почва.

Влажность. Влажность субстрата 60 – 80 % является оптимальной. После дождей, когда в почве много воды, дождевые черви выползают на поверхность. В случае прогрессирующего подсыхания наблюдается перемещение червей в более влажные зоны. Если содержание влаги в почве долгое время ниже 30 – 35 %, численность червей снижается, хотя они могут без ущерба терять 50 – 60 % воды от веса тела. При влажности почвы 22 % черви погибают в течение одной недели. При выращивании дождевых червей в лабораторных условиях их максимальный вес и плодовитость достигаются при влажности субстрата 70 – 85 %, т. е. близкой

к содержанию воды в теле дождевого червя.

Температура и pH. Температура +15 – 25 °С и pH среды обитания 7,0 – 7,6 оптимальны для размножения дождевых червей. На полях без растительности и пищи черви гибнут при температуре, близкой к нулю. От холода черви спасаются, уходя в более глубокие горизонты почвы. Таким же образом они избегают высоких температур. Дождевые черви не обитают в среде с pH <5,0 или pH >9,0.

В умеренных широтах в теплое время года активная деятельность дождевых червей продолжается до семи месяцев. В зимний период дождевые черви впадают в спячку. При понижении температуры ниже +10 °С они начинают переходить в состояние покоя, при +6 °С – перестают питаться, а при +4 – +5 °С у них освобождается содержимое пищеварительного тракта. С началом заморозков и промерзания верхнего горизонта почвы на 5 – 6 см они уходят в глубокие слои почвы. Весной, с началом оттепелей дождевые черви переходят в активное состояние за 10 – 15 дней до исчезновения мерзлого слоя почвы, причем они могут выползать даже на снег.

Освещенность. Многие черви боятся света и ультрафиолетовых лучей – для поиска полового партнера они выползают из своих норок только ночью, поэтому зона их обитания не должна освещаться ни естественными, ни искусственными источниками света.

Аэрация и продукты гниения. Виды червей, пригодные для вермикультуры, в естественных условиях обитают преимущественно в поверхностном хорошо аэрируемом слое почвы. Они чрезвычайно чувствительны к выделению газов, образующихся в процессе гниения: аммиаку, сероводороду, метану. Допустимый уровень содержания аммиака – 0,5 мг/кг субстрата. При более высоком содержании газа черви погибают. Поэтому в промышленных установках вермикультивирования стараются избегать образования мертвых (застойных) зон и поддерживают содержание кислорода в газовой фазе не менее 15 %, а CO_2 – не более 6 %.

Плотность популяции. На размножении червей отрицательно сказывается перенаселенность перерабатываемого субстрата: черви испытывают стресс и

возбуждаются. В этих условиях возможны случаи каннибализма. Поэтому плотность популяции является важным контролируемым показателем.

Виды, пригодные для вермикультивирования и вермикомпостирования

Из всего разнообразия дождевых червей для вермикультуры пригодны только несколько видов:

− навозный червь Eiseniafoetida;

− подвиды E. foetida foetid, foetida andrel;

− обыкновенный дождевой червь (или большой красный выползок) Lumbricus terrestris;

− малый красный червь (малый выползок) Lumbricus rubellus;

− несколько других видов (дендробена Dendrobaena и др.).

Свойства продуктов и применение вермикультивирования и вермикомпостирования

В результате переработки органических отходов дождевыми червями получают биогумус.

Биогумус, иначе называемый вермикомпостом, представляет собой материал, прошедший через кишечник животного, и остатки исходного субстрата.

Черви пропускают через кишечник различные вещества: растительные остатки, органические отходы, минеральные вещества почвы. Проходя через пищеварительный тракт червей, они подвергаются размельчению и существенным биохимическим изменениям: органические соединения расщепляются на более простые вещества, обогащаются соединениями калия, магния, фосфора и ферментами (каталазой, дегидрогеназой). Минеральные соли трансформируются в легкодоступные формы для растений, при этом также происходит нейтрализация кислот, содержащихся в первичном субстрате. В процессе переваривания растительных остатков в кишечнике червей уменьшается содержание легко и трудногидролизуемых полисахаридов и лигнина, одновременно развиваются процессы поликонденсации низкомолекулярных продуктов распада органических веществ, образуются молекулы гуминовых кислот, имеющих нейтральную реакцию. В результате продукт

жизнедеятельности червей – копролиты (от греч. копрос – помет, литое – камень) представляет собой материал, обогащенный биологически активными соединениями, гуминовыми веществами и полезной микрофлорой и приближающийся по своим физико-химическим свойствам к почвенному гумусу. По содержанию гумуса биогумус превосходит навоз и компосты в 4 – 10 раз. В копролитах червей естественных популяций содержится 11 – 15 % гумуса, а в копролитах культивируемых – от 25 до 35 % на сухое вещество. Цена вермикомпостов непосредственно определяется содержанием гумуса.

Как органоминеральное удобрение биогумус обладает ценными физическими свойствами: высокой влагоемкостью, влагостойкостью и механической прочностью, сыпучестью, технологичностью в использовании. Азота в нем в 5 раз, фосфора – в 7 раз, калия – в 11 раз больше, чем в почве, в которой обитают черви. В 1 г сухого биогумуса содержится 10^{10} – 10^{11} клеток микроорганизмов (для сравнения в навозе крупного рогатого скота 10^{8} – 10^{9} кл./г) при отсутствии патогенной микрофлоры и зоофауны, жизнеспособных семян сорных растений. Разнообразная микрофлора (актиномицеты, бактерии аммонификаторы, тарификаторы, растворяющие органические и минеральные фосфаты, целлюлолитики и др.), присутствующая в биогумусе, нормализует развитие свойственных здоровой почве микробных ассоциаций и обеспечивает подавление почвенных патогенных микроорганизмов, в частности, сальмонелл. Биогумус содержит биологически активные вещества – лумбрицины, вырабатываемые червями, ауксины, гиббереллины и другие фитогормоны. Биогумус не обладает канцерогенными, мутагенными или тератогенными свойствами.

Другим преимуществом вермикомпостов является отсутствие неприятных запахов – в процессе переработки любой имеющийся материал дезодорируется через несколько дней и приобретает земельный запах.

Благодаря своим механическим, физико-химическим свойствам и высокому содержанию питательных элементов, фитогормонов и других биологически активных веществ, биогумус ускоряет прорастание семян и сроки созревания плодов (на 10 – 15 сут.), увеличивает процент всхожести семян, что сокращает их

норму высева, повышает засухоустойчивость и морозоустойчивость растений, их устойчивость к вредителям и болезням, снижает стресс при пересадке растений, стимулирует корнеобразование. Внесение в почву биогумуса исключает перенасыщение ее отдельными видами питательных элементов, как это случается при внесении высоких доз навоза и обычных компостов. Вермикомпост хорошо сочетается с теми или иными минеральными и химическими удобрениями.

Типичные нормы внесения биогумуса под основные сельскохозяйственные культуры составляют 4–10 т/га, в отличие от навоза, которого требуется ежегодно вносить 30–40 т/га.

Наряду с биогумусом вермикультивирование позволяет получать другую товарную продукцию – биомассу дождевых червей, богатую полноценным кормовым белком и жирами. В сухой биомассе дождевых червей может содержаться до 60 – 65 % белков и до 20 % жиров. Эта белково-витаминная кормовая добавка обладает высокой биологической ценностью.

Вермикомпостированию и обезвреживанию в той или иной степени поддаются сельскохозяйственные отходы, навоз и птичий помет, бытовой мусор, осадки сточных вод, отходы пищевой, целлюлозно-бумажной, деревообрабатывающей, кожевенной, гидролизной, фармацевтической и других отраслей промышленности, различные материалы, загрязненные токсичными веществами.

В естественных условиях деструкция отходов продолжается длительное время (несколько лет и более). При вермикомпостировании разложение органического материала ускоряется в 2 – 10 раз, наблюдается уменьшение объема органических отходов на 40 – 60 %, происходит дезодорация и обеззараживание компоста, частично снижается зараженность патогенами, в частности, сальмонеллами и яйцами гельминтов.

Для культивирования червей и переработки этих органических отходов в биогумус последние должны сначала подвергаться выдерживанию в естественных условиях (в теплое время года свиной навоз – 5 – 6 мес, навоз крупного рогатого скота – 3 – 4 нед., помет кроликов 5 – 10 сут.), при котором происходят процессы

анаэробного сбраживания навоза, или подвергаться микробиологическому компостированию. Для этого навоз или помет предварительно перемешивают с соломой, опилками, сеном, макулатурой или другими органическими наполнителями в соотношении 1:1 (по сухому веществу). Можно использовать торф, нейтрализованный добавками извести или доломита. После предварительного выдерживания или компостирования навоз или помет подвергают вермикомпостированию.

Биогумус, полученный при переработке навоза крупного рогатого скота с помощью промышленных линий дождевых червей, содержит:

− влаги	40 − 60 %
− общего азота	3 – 4 %
− общего фосфора	1 – 3 %
− гуминовых веществ	22 – 30 %

Вермикомпостирование различных растительных субстратов можно существенно ускорить путем их предварительной обработки: запариванием, частичным гидролизом химическими реагентами или обработкой целлюлолитичес-кими микроорганизмами или ферментами. Предобработка позволяет также сделать доступными для вермикомпостирования такие субстраты, как кора деревьев, лигнин.

Пример композиции для вермикопостирования навоза совместно с другими отходами (по Г. А. Жарикову, 1998; приведены объемные соотношения):

− навоз КРС	45 − 50 %
− свиной или овечий навоз	5 – 10 %
− торфо-навозный компост	15 – 20 %
− солома, кукуруза	15 %
− отходы овощеводства	5 %

Для линий червей, селекционированных для переработки отходов целлюлозно-бумажного комбината, оптимальны композиции следующего состава, отличающиеся в зависимости от метода и условий культивирования (по Л. В. Рудаковой, 1996):

− кора 1 − 2-летнего срока хранения 25 − 50 %

− кора 30-летнего срока хранения 0 – 20 %

− избыточный активный ил 20 – 45 %

− речной песок 10 − 30 %

Соблюдение оптимальных пропорций позволяет достичь полной переработки исходного субстрата за 2,5 – 3 мес.

Разрыхление почвы земляными червями облегчает дренаж воды и проникновение газов, корней растений в подпочву. Благодаря деятельности червей органические материалы в почве, включая загрязненные, быстрее разлагаются и распределяются более равномерно, почва обогащается не только биогуму-сом-копролитами, но и витаминами, фитогормонами и другими биологически активными соединениями, подвижными формами питательных веществ (P_2O_5 и K_2O).

Вермикультуру предложено использовать для ремедиации почв, загрязненных радионуклидами. Внесенные в почву черви улучшают дренируемость почв, что способствует выведению радионуклидов в более глубокие подпочвенные горизонты. Также с помощью червей радионуклиды можно извлекать из почвы. Радионуклиды накапливаются в массе червей. Черви собираются с использованием приманки и сжигаются, оставшаяся зола прессуется.

В качестве варианта повышения эффективности метода биоремедиации можно использовать комбинированную очистку загрязненных почв с помощью микроорганизмов-деструкторов и дождевых червей. Такая двухстадийная схема была предложена для очистки почв, загрязненных ПХБ. На первой стадии свободные и связанные с гуминовыми веществами почвы полихлорированные бифенилы разлагаются с помощью бактерий-деструкторов, на второй полученный материал обрабатывается с помощью дождевых червей. Для дезактивации почв, загрязненных радионуклидами, предложена комплексная технология, включающая биоаккумуляцию дождевыми червями, обработку микроорганизмами и биосорбентами. Загрязненную радионуклидами биомассу червей озоляют, остекловывают и захоранивают на специальных полигонах.

Общая схема проведения ремедиационных мероприятий, включающая использование специализированных микроорганизмов и дождевых червей, представлена на рис. 1.12.



Рис. 1.12 Принципиальная схема ремедиации почв биотехнологическими методами с использованием вермикультуры

Основные условия использования червей в поле:

− внесение червей в рыхлую и мягкую почву;

− содержание растворимых солей, в том числе вносимых с золой, не должно превышать 0,5 %;

− pH почвы должен быть близким к нейтральному (7,0 ± 0,5); для выравнивания кислотно-щелочного равновесия почвы в нее необходимо вносить гипс (для щелочных почв) или карбонат кальция – мел, известь или доломитовую муку (для кислых почв);

− влажность почвы должна быть достаточно высокой (выше 30 %, оптимальное значение 60 – 70 %);

− необходимо оберегать червей от их естественных врагов: птиц, кротов, землероек и других;

− использование химических пестицидов, угнетающих развитие червей, в поле с вермикультурой недопустимо.

Технологические основы вермикультивирования и вермикомпостирования

Как удобрения, средства рекультивации или при использовании в качестве кормовой добавки вермикомпост и вермикультура не должны быть дорогими продуктами, поэтому наиболее распространенные способы и технологии их полчения относительно простые.

По степени создания оптимальных условий способы компостирования можно разделить на три группы:

− на открытых площадках или полевое вермикультивирование и вермикомпостирование – менее контролируемые условия;

− в закрытых помещениях – более контролируемые и оптимальные условия;

− комплексные (одновременно на открытых площадках и в закрытых помещениях).

Компостирование открытым способом в организации процесса более простое, дешевое и экстенсивное, в закрытых помещениях – более интенсивное (производительнее на единицу площади или объема), однако разница не очень велика, поскольку скорость роста и развития дождевых червей в закрытом по-

мещении лишь ненамного (в лучшем случае в 2 – 3 раза) выше, чем на открытых площадках.

По методам культивирования переработку органических отходов с помощью дождевых червей можно разделить на грядовую (буртовую), траншейную, ящичную, реакторную. Под открытым небом используют буртовый и траншейный варианты. В условиях закрытого фунта – преимущественно буртовый, ящичный и реакторный методы.

В странах с теплым климатом чаще всего применяют вермикультивирование, основанное на открытой грядовой форме содержания червей.

Грядовые (буртовые) и траншейные методы рассчитаны на теплое время года. В зимнее время при дополнительном небольшом укрытии черви нормально перезимовывают, но процесс вермикомпостирования при этом не идет. В зависимости от климатических условий и вида отходов цикл компостирования в одной гряде или траншее составляет 3, 6 или 12 месяцев. В условиях теплиц процесс вермикомпостирования может продолжаться круглый год. Применяют также пленочные теплицы туннельного типа с обогревом. В них можно вести хозяйство интенсивными методами.

Для проведения процесса на открытых площадках по буртовой или грядовой технологии из приготовленных отходов на подготовленном бетонном или грунтовом основании формируют гряды в основании размером (1 – 1,5)×(1,5 – 2) м и высотой 0,15 – 0,4 м. Такие размеры гряд обусловлены необходимостью равномерного расселения вермикультуры по всей массе субстрата, хорошей аэрации материала и избежания избыточного давления на живые организмы толщи субстрата. Укладывается бурт в виде пирамиды или трапеции в сечении. Гряды располагают по розе ветров (для уменьшения ветровой эрозии). Определенное значение для поддержания в дальнейшем оптимального температурного режима имеет и пространственное расположение (по отношению к сторонам света) вермигряд, а также цвет и толщина мульчирующего (утепляющего) покрытия гряды. Открытые площадки должны быть спланированы с небольшим уклоном, обеспечивающим сток избыточной воды. Для обеспечения нейтрального значения

pH вносят гипс (для защелаченных субстратов), мел, доломит, гашеную известь (для закисленных субстратов). После формирования гряды увлажняют и оставляют для выстаивания на 4 – 6 сут.

Затем в гряды вводят червей. Заселение гряд производится простым опрокидыванием ящиков. Для заселения используются молодые, но уже окольцованные половозрелые черви одного возраста. Они лучше адаптируются к новым для них условиям обитания и к смене компостируемого материала.

На привыкание червей к новому субстрату уходит 7 – 10 дней. В течение первых трех месяцев черви должны усиленно питаться и размножаться. В сутки они потребляют количество корма, равное их весу. Для стимулирования деятельности червей и поддержания оптимальных условий обитания в подкормочную смесь могут добавлять мел, измельченную глину, различные кормовые добавки (барду, кофейную гущу, продукты, содержащие белок – молочный порошок, соевую муку и т. п.). Если активность червей нормальная, то первую подкормку проводят спустя месяц от начала вермикомпостирования. Пригодность подкормки для питания червей определяют заблаговременно в тестанализе на их активность и выживаемость, выполняемом в течение месяца в небольших ящиках, в которые засыпают корм и помещают несколько десятков червей.

Черви привыкают к компосту определенного химического состава и на адаптацию к новому для них субстрату требуется значительное время, поэтому в технологическом процессе желательно обеспечивать постоянный состав сырья.

При подкормке на поверхности гряд, где образовался переработанный слой, раскладывают новые порции субстрата слоем 5 – 15 см. В теплое время слой должен быть тоньше из-за опасности перегрева гряды. В дальнейшем аналогичные подкормки проводят с периодичностью 1 раз в три-четыре недели – для открытых площадок и 1 раз в одну-две недели – для отапливаемых помещений. Последний докорм червей при культивировании под открытым небом проводят в конце сентября – начале октября.

По ходу вермикомпостирования гряды с червями 2 – 3 раза в неделю ворошат

и поливают отстоенной водопроводной водой для поддержания оптимальной влажности и аэрирования гряды. В прохладное время гряды укрывают мешковиной.

К концу цикла размножения в грядах-культиваторах популяция червей возрастает до 50 – 60 тыс. особей на каждом квадратном метре, а высота гряды увеличивается до 0,7 – 0,8 м. Выход копролитов с 1 т исходного материала составляет 550 – 600 кг (60 % влажности).

В траншейной технологии перерабатываемый материал закладывается в траншею длиной 2 – 3 м, шириной 1 – 1,5 м и глубиной 0,5 – 1 м. Стены траншеи выкладываются досками, строительными блоками или другим материалом. Для дополнительной аэрации всей толщи субстрата и избежание его слеживания в траншее могут устанавливать аэрационные трубы из пористого или сетчатого материала.

Недостатки буртовой и траншейной технологий – необходимость больших площадей при низком коэффициенте использования рабочего объема помещений в закрытом варианте, сложность поддержания оптимальных условий процесса из-за возможных пересыханий или переувлажнения субстрата, сложность контроля за его компостированием, возможность вымерзания вермикультуры в траншеях и буртах в зимнее время.

В ящичной технологии культивирование и компостирование проводятся на стеллажах, в контейнерах, лотках или кассетах при температуре 20 – 22 ^{o}C. Для вермикультивирования используются ящики или лотки глубиной 30 – 50 см из дерева, пластмассы, с дренажными отверстиями. Субстрат укладывают на половину заполнения ящиков слоем 15 – 25 см, заселяют червями из расчета 10 – 15 тыс. экз./м^2 и помещают на стеллажи или устанавливают в кассеты. Поверхности субстратов закрывают техническим сукном или другим воздухопроницаемым материалом во избежание пересыхания верхних слоев. Также применяются стеллажи с сетчатым дном с установленными внизу поддонами, что облегчает сбор вермикомпоста. Периодически, раз в 7 – 10 дней в ящики, лотки или стеллажи добавляется новая порция исходного субстрата,

который наслаивается слоем в 5 – 10 см и увлажняется. В конце цикла культивирования они освобождаются от содержимого, заполняются новой порцией перерабатываемого материала и заселяются маточной культурой червей.

Хотя ящичная технология позволяет повысить коэффициент использования полезного объема помещений, она трудоемка, поэтому малопригодна для переработки значительных количеств отходов.

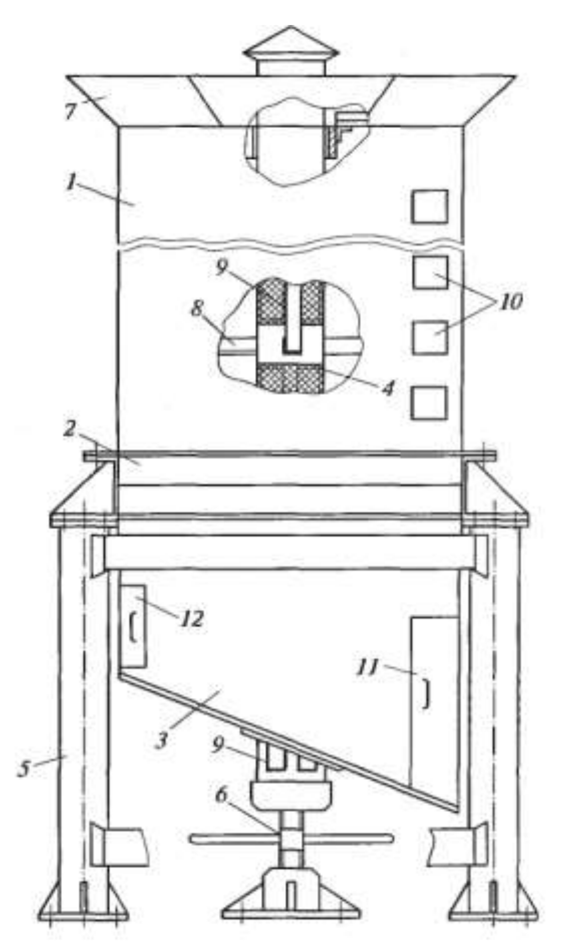
Во всех вариантах вермикультивирования и вермикомпостирования в случае необходимости червей отделяют от компоста.

Наиболее эффективным для удаления червей из вермикомпоста считается метод приманки. По одному из вариантов черви выдерживаются на голодном пайке около 3 недель, затем сбоку или сверху насыпается свежий корм и проводится дождевание. Привлеченные черви переползают в свежий корм, освобождая готовый вермикомпост.

Существуют автоматизированные системы вермикомпостирования в поддонах и кассетах. Однако с точки зрения создания наиболее оптимальных условий среды, достижения максимальной производительности, механизации работ, облегчения обслуживания процесса и контроля за ним, наиболее перспективна технология переработки субстратов с помощью промышленных биореакторов различной конструкции: башенного типа, вращающихся горизонтальных барабанов и др. В реакторах подобного типа необходимо предусматривать проведение процесса при оптимальной температуре (20 – 25 °С), аэрации, равномерном орошении всей толщи перерабатываемого субстрата без образования застойных анаэробных зон, систему дренажа и сбора избытка орошающей жидкости, опорные элементы, препятствующие слеживанию и уплотнению субстрата, его слипанию и зависанию при разгрузке, возможность производить послойную загрузку вермикультуры и осуществлять постоянный контроль за ходом процесса переработки и состоянием вермикультуры, отделять основную массу червей от переработанного субстрата непосредственно внутри реактора.

Пример конструкции опытно-промышленного биореактора вертикального

типа представлен на рис. 1.13.



1 − корпус реактора; 2 − разгрузочный шибер; 3 − разгрузочный отсек; 4 − аэрационная труба; 5 − опоры; 6 − привод движения аэрационной трубы; 7 − загрузочная горловина; 8 − разгружающие элементы; 9 − аэрационные отверстия; 10 − смотровые окна; 11 − разгрузочный люк; 12− технологический люк

Рис. 1.13 Принципиальная схема конструкции опытно-промышленного реактора вермикультивирования

Биореактор включает три зоны: зону загрузки, рабочую зону и зону разгрузки. Зона загрузки состоит из загрузочной горловины. Рабочая зона включает корпус реактора, устройство аэрации, разгрузочные рамки. В зону разгрузки входит обечайка с наклонным днищем, два люка: разгрузочный и технологический, привод движения аэрационной трубы. Корпус биореактора изготовлен из цилиндрической обечайки из нержавеющей стали высотой 3 м и

диаметром 1,8 м.

При высоте загрузочного слоя свыше 2 м в нижней части установок вертикального типа в результате уплотнения и слеживаемости субстрата образуются мертвые зоны, характеризующиеся недостаточным поступлением воздуха и развитием анаэробных процессов распада органических веществ загруженного субстрата. Образование мертвых зон способствует накоплению балласта, снижению качества готового продукта, угнетает рост червей и даже может привести к их полной гибели под действием токсичных продуктов гниения в нижней части установок. В конструкции биореактора, изображенной на рис. 1.13, для устранения возможности образования застойных зон в центральной части корпуса располагается устройство аэрации в виде перфорированной трубы с диаметром аэраци-онных отверстий 20 мм, а на аэрационной трубе на расстоянии 1 м друг от друга в горизонтальном направлении закреплены разгрузочные рамки, изготовленные из металического уголка.

Разгрузочные рамки необходимы для снижения давления вышележащих слоев субстрата и рыхления его во время движения аэрационной трубы. Рамки не оказывают повреждающего действия на вермикультуру и не препятствуют равномерному орошению всей толщи субстрата.

Окна, расположенные на корпусе биореактора, необходимы для контроля послойной загрузки вермикультуры. Наличие технологического люка в зоне разгрузки позволяет контролировать степень деструкции отходов, оценить качество готового продукта и установить время завершения компостирования.

По окончании процесса производится отделение выгружаемого готового продукта от свежеприготовленного и загруженного в биореактор субстрата с помощью отсечных шиберов, выполненных в виде вил. Привод движения аэрационной трубы устраняет зависание и прилипание субстрата при выгрузке путем перемещения вверх-вниз аэрационной трубы.

Процессы разгрузки готового продукта и дозагрузки реактора свежим субстратом разделены по времени для того, чтобы дать возможность червям переползти в верхние слои субстрата. После перехода работы установки в

циклический режим, операции дозагрузки и выгрузки повторяют периодически каждые 2 недели.

В наиболее производительных вермиреакторах весь цикл вермикомпостирования длится всего 7 сут., при этом на площади 20 $м^2$ получают 1 т биогумуса в сутки. Стоимость такого устройства составляет 40 – 50 тыс. долл.

Затраты на внедрение механизированной технологии с использованием специализированных промышленных биореакторов окупаются в течение двух лет. Хранят гумус во влажном, высушенном или замороженном виде.

1.8.4 Силосование

Отходы сельского хозяйства можно использовать для получения кормов силосованием. Силосование – заквашивание, анаэробное консервирование кормов без доступа воздуха; наиболее распространенный способ заготовки сочных кормов.

Традиционно силосуют растительный зеленый корм: луговую траву, клевер, люцерну, стебли и листья кукурузы, подсолнечника, ботву сахарной свеклы и жома, а также кормовые корнеплоды, бахчевые и т. п., при этом повышается их питательная ценность и полученная силосная масса консервируется. Основную роль в процессе силосования выполняют молочнокислые бактерии, источником питания для которых служат водорастворимые углеводы, поэтому содержание последних в корме определяет его силосуемость.

В состав травы входят структурные углеводы (гемицеллюлоза, целлюлоза), формирующие растительные волокна, и запасные углеводы (ферментируемые сахара). В травах умеренного пояса волокна составляют 30 – 40 % сухих веществ, основные запасные углеводы, фруктаны – 5 – 7 % СВ, истинные ферментируемые сахара (фруктоза, глюкоза, сахароза) – около 10 % СВ.

В процессе созревания и хранения силоса растительная масса претерпевает ряд стадий трансформации, обусловленных последовательным развитием различных микроорганизмов, потребляющих в первую очередь доступные углеводы. Этот микробиологический процесс можно представить как сукцессию в

экосистеме – силосной массе. В классическом (так называемом холодном способе) силосования выделяют 4 стадии (рис. 1.14).

I. Аэробная стадия. На этой стадии наблюдается потребление оставшегося атмосферного кислорода в сырье растительными ферментами в еще дышащих растениях и размножение аэробных бактерий, входящих в состав эпифитной микрофлоры силосуемых растений. Стадия непродолжительна.

II − IV. Анаэробные стадии.

II. Развитие молочнокислых стрептококков и энтеробактерий. Эти микроорганизмы наиболее физиологически активны при pH 5,0 – 6,5, характерном для закладываемой силосуемой массы, поэтому они начинают развиваться на ранней стадии силосования. В результате протекания анаэробных процессов брожения в растительной массе накапливаются молочная и уксусная кислоты. Стадия непродолжительна.

III. Развитие лактобацилл. Эта фаза наиболее продолжительная и определяющая в созревании силоса.

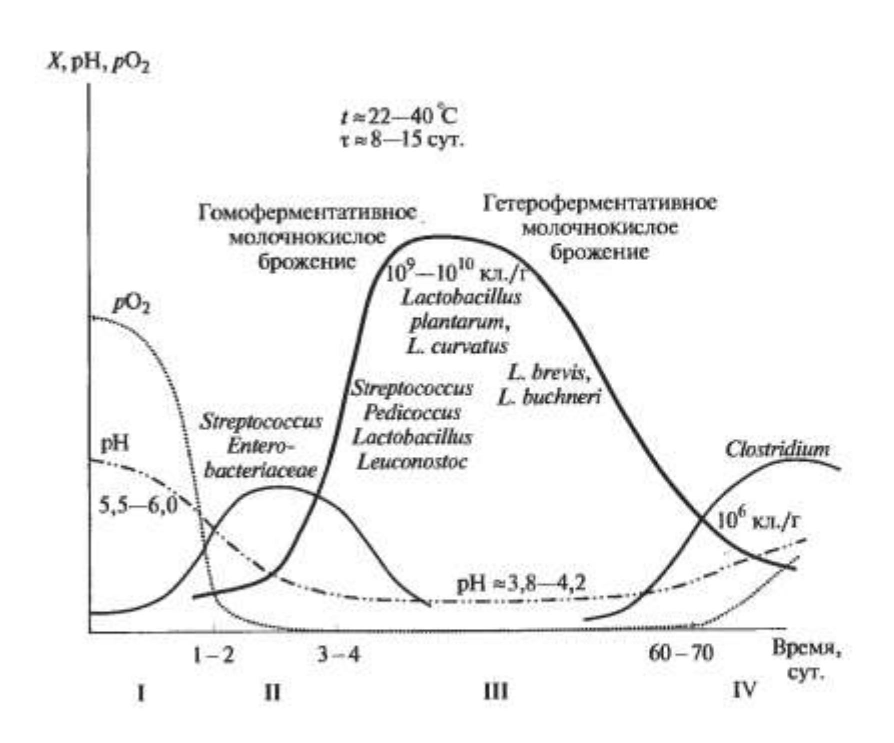


Рис. 1.14 Развитие микробного сообщества при созревании и консервации силоса холодным способом

По мере созревания силоса pH падает ниже 5,5, в силосной микрофлоре

начинают доминировать лактобациллы. Вначале размножаются гомоферментативные лактобациллы, осуществляющие гомоферментативное брожение сахаров с образованием молочной и уксусной кислоты:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ CH_3CHOHCOOH \quad (3.11)$$

Глюкоза, фруктоза

$$C_5H_{10}O_5 - 4\ CH_3CHOHCOOH + CH_3COOH \quad (3.12)$$

Арабиноза, ксилоза

В процессе этого брожения потерь сухих веществ нет, потери энергии незначительны.

К концу этой стадии начинают доминировать гетероферментативные виды, сбраживающие сахара с образованием молочной кислоты и этанола и выдерживающие более высокие концентрации накапливающейся уксусной кислоты:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CHOHCOOH + C_2H_5OH + CO_2 \quad (3.13)$$

Глюкоза, фруктоза

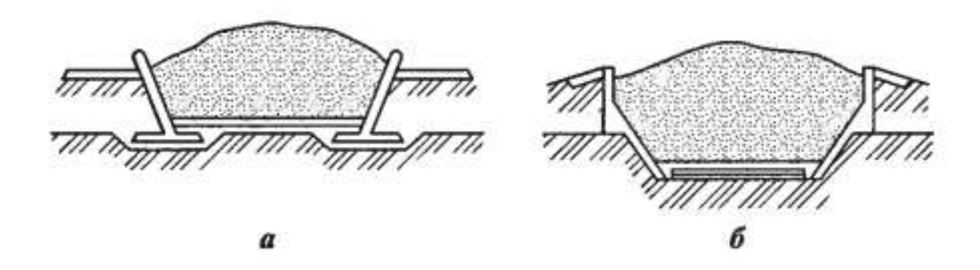
При гетероферментативном брожении наблюдаются потери сухого вещества − около 20 %.

В естественной микрофлоре преобладают гетероферментативные молочнокислые бактерии.

В процессе силосования вследствие образования молочной и уксусной кислот pH постепенно понижается и стабилизируется на уровне 3,8 – 4,2. Концентрация молочнокислых бактерий достигает 10^9 – 10^{10} кл. на 1 г силосной массы на 8 – 15 сутки силосования, температура повышается до 22 – 40 ^{o}C.

IV. Развитие бактерии.Clostridium. Они начинают развиваться в силосе при pH > 5,0, используя оставшиеся углеводы, молочную кислоту и аминокислоты силоса, образуют масляную кислоту, которая слабее, чем молочная, и аммиак. В результате постепенно снижается кислотность и более интенсивно развиваются гнилостные микроорганизмы, что приводит к порче силоса.

Силосование проводят в ямах, траншеях, буртах или силосных башнях. При наличии на ферме кормоцеха, силосные сооружения располагают при них.



а – наземные траншеи; б – полузаглубленные траншеи

Рис. 1.15 Схема траншей для силосования

Наиболее распространено силосование в траншее. Траншеи устраивают по возможности на возвышенном месте, на площадках с уклоном для стоков поверхностных вод, с доступом для транспортных средств. В них закладывают от 250 до 3000 т силоса. Наземные траншеи сооружают на участках с ровным рельефом и высоким уровнем грунтовых вод (рис. 1.15). Они имеют высоту не более 3 м. Заглубленные и полузаглубленные траншеи, глубиной не менее 3 м, устраивают на участках с низкопроницаемыми глинистыми, суглинистыми грунтами со сравнительно низким уровнем грунтовых вод. Стены и днища траншей изготавливают из бетона, железобетона, кирпича, сборных железобетонных элементов. Торцы наземных траншей после закладки силоса закрывают деревянными щитами или тюками из соломы, выступающие над поверхностью земли стены утепляют вынутым грунтом. Для стока атмосферных и дренажных вод около силосных сооружений устраивают канавы.

При закладке силоса важно создать анаэробные условия, обеспечить доминирование молочнокислых бактерий (их общее количество должно быть 10^5 – 10^6 кл./г силосной массы). Кроме того, растительное сырье должно содержать много сухих веществ и особенно редуцирующих веществ (сахаров). В районах с умеренным климатом содержание сахаров в растительной массе более низкое, при таких условиях доминируют гетероферментативные молочнокислые бактерии.

На силос закладывают массу с 25 – 30 % сухого вещества. Если содержание СВ < 25 %, – используются добавки сухих кормов и силосные добавки для достижения хорошей ферментируемости и уменьшения потерь силоса.

Один из вариантов силосования – приготовление сенажа. В этом случае биологическому консервированию в силосных сооружениях подвергается измельченная растительная масса, предварительно подсушенная (подвяленная) с содержанием 35 – 45% сухого вещества. Относительная сухость, создаваемая в сенаже, замедляет развитие молочнокислых бактерий, а также оказывает губительное влияние на рост нежелательных микроорганизмов.

Возможны 2 способа силосования: холодный и горячий.

Холодный способ силосования более распространен, что объясняется как сравнительной его простотой, так и хорошим качеством получаемого корма. При холодном способе силосования скошенную растительную массу, если нужно, измельчают, укладывают до отказа в кормовместилище, утрамбовывают, сверху как можно плотнее укрывают для изоляции от воздуха. Созревание силоса идет при умеренном повышении температуры, максимум до 40 °С; при оптимальной 25 – 30 °С. Общие потери сухих веществ корма при холодном силосовании не превышают 10 – 15 %.

Горячий способ силосования используется для квашения грубостебельчатых, малоценных кормов, которые после обработки при повышенной температуре лучше поедаются скотом. В этом случае сооружение заполняют по частям. Зеленую массу на один − два дня рыхло укладывают слоем около 1 – 1,5 м. При значительном количестве воздуха в ней начинают развиваться аэробные процессы, сопровождаемые большим выделением тепла, в результате чего температура корма поднимается до 45 – 50 °С. Затем укладывают второй слой такой же толщины, как и первый, и он, в свою очередь, подвергается разогреванию. Растения, находящиеся внизу и размягченные под влиянием высокой температуры, спрессовываются под тяжестью нового слоя корма, при этом воздух из нижнего слоя силоса удаляется, аэробные процессы в нем прекращаются и температура снижается. Так слой за слоем заполняют все силосохранилище. Самый верхний слой корма утрамбовывают и укрывают от доступа воздуха. Аэробные процессы приводят к окислению части веществ до CO_2 и H_2O, что приводит к потере значительного количества питательных

веществ корма – до 30 и более, резко уменьшается переваримость белков. Поэтому горячее силосование не может считаться рациональным способом сохранения растительной массы.

О качестве силосованного корма можно судить по составу органических кислот, накопившихся при брожении.

Силос хорошего и высокого качества имеет следующий усредненный состав:

− СВ	20 − 23 %
− аммонийный азот, % от общего	7 – 10 %
− сырой протеин	14 – 16 % от СВ
− перевариваемый сырой протеин	80 – 110 г/кг СВ
− pH	4,0 − 4,2

Для достижения хорошей ферментируемости и уменьшения потерь силоса часто используют силосные добавки.

Силосные добавки могут быть ингибиторами и стимуляторами ферментации. Ингибиторы – кислотные добавки (серная и смесь серной и соляной кислот, муравьиная, сорбиновая кислоты, смеси органических кислот: муравьиной, уксусной, пропионовой) и консерванты (формальдегид, параформальдегид). Стимуляторы – источники углеводов (патока, барда), молочнокислые бактерии, ферменты.

Кислоты трудно равномерно распределять в толще силосной массы, поэтому часть силоса может иметь повышенную кислотность.

РАЗДЕЛ 2. ОСНОВЫ ПРИКЛАДНОЙ КЛЕТОЧНОЙ И ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

2.1. Основы клеточной инженерии

Основой клеточной инженерии является гибридизация соматических клеток – слияние неполовых клеток с образованием единого целого. Слияние клеток может быть полным или же клетка-реципиент может приобрести отдельные части клетки-донора: цитоплазму, митохондрии, хлоропласты, ядерный геном или его

крупные блоки. Введение небольших блоков генетической информации обычно осуществляется средствами генетической инженерии. Соматическая гибридизация имеет более широкие возможности для скрещивания филогенетически отдаленных организмов, чем половое скрещивание, при котором природа допускает лишь строго определенные сочетания родительских форм.

2.2. Этапы получения гибридных клеток

Слиянию клеток предшествует установление тесного контакта между плазматическими мембранами. Этому препятствует наличие поверхностного заряда на природных мембранах, обусловленного отрицательно заряженными группами белков и липидов. Деполяризация мембран переменным электрическим или магнитным полем, нейтрализация отрицательного заряда мембран с помощью катионов способствуют слиянию клеток. На практике широко пользуются ионами Ca^{2+}, хлорпромазиноном. Эффективным "сливающим" (фузогенным) агентом служит полиэтиленгликоль.

По отношению к животным клеткам применяют также вирус Сендай, действие которого как сливающего агента, по-видимому, связано с частичным гидролизом белков цитоплазматической мембраны. Участок субъединицы $Г_1$ вируса обладает протолитической активностью. Растительные, грибные и бактериальные клетки перед слиянием освобождают от клеточной стенки, при этом получаются протопласты. Клеточную стенку подвергают ферментативному гидролизу, применяя лизоцим (для бактериальных клеток), зимолиазу улитки (для клеток грибов), комплекс целлюлаз, гемицеллюлаз и пектиназ, продуцируемый грибами (для клеток растений). Набухание и последующее разрушение протопластов предотвращается созданием повышенной осмолярностй среды. Подбор гидролитических ферментов и концентраций солей в среде с целью обеспечения максимального выхода протопластов представляет собой сложную задачу, решаемую в каждом случае отдельно.

Для скрининга полученных гибридных клеток используют различные подходы: 1) учет фенотипических признаков; 2) создание селективных условий, в которых выживают лишь гибриды, объединившие геномы родительских клеток.

2.3. Метод слияния клеток, его значение

Метод слияния соматических клеток открывает перед биотехнологией значительные перспективы.

1. Возможность скрещивания филогенетически отдаленных форм живого. Путем слияния клеток растений получены плодовитые, фенотипически нормальные межвидовые гибриды табака, картофеля, капусты с турнепсом (эквивалентные природному рапсу), петунии. Имеются стерильные межродовые гибриды картофеля и томата, стерильные межгрибные арабидопсиса и турнепса, табака и картофеля, табака и беладонны, которые образуют морфологически ненормальные стебли и растения. Получены клеточные гибриды между представителями различных семейств, существующие, однако, лишь как неорганизованные растущие клетки (табака и гороха, табака и сои, табака и конских бобов). Получены межвидовые (Sacharomyces uvarum u S. diastaticus) и межродовые (Kluyveroniyces lactis u S. serevisicac) гибриды дрожжей. Имеются данные о слиянии клеток различных видов грибов и бактерий.

Несколько курьезными представляются опыты по слиянию клеток организмов, относящихся к различным царствам, например клеток лягушек и протопластов морковки. Гибридная растительно-животная клетка постепенно одевается клеточной стенкой и растет на средах, на которых культивируются растительные клетки. Ядро животной клетки, по-видимому, достаточно быстро теряет свою активность.

2. Получение асимметричных гибридов, несущих полный набор генов одного из родителей и частичный набор другого родителя. Такие гибриды часто возникают при слиянии клеток организмов, филогенетически удаленных друг от друга. В этом случае вследствие неправильных делений клеток, обусловленных некоординированным поведением двух разнородных наборов хромосом, в ряду поколений теряются частично или полностью хромосомы одного из родителей.

Асимметричные гибриды бывают устойчивее, плодовитее и жизнеспособнее, чем симметричные, несущие полные наборы генов родительских клеток. В целях асимметричной гибридизации возможна избирательная обработка клеток одного

из родителей для разрушения части его хромосом. Возможен прицельный перенос из клетки в клетку нужной хромосомы. Представляет также интерес получение клеток, у которых гибридной является только цитоплазма. Цитоплазматические гибриды образуются, когда после слияния клеток ядра сохраняют свою автономию и при следующем делении гибридной клетки оказываются в разных дочерних клетках. Скрининг таких клеток проводится по генам-маркерам ядерного и цитоплазматических (митохондриального и хлоропластного) геномов.

Клетки со слившейся цитоплазмой (но не ядрами) содержат ядерный геном одного из родителей и в то же время совмещают цитоплазматические гены слившихся клеток. Есть указания на рекомбинацию ДНК митохондрий и хлоропластов в гибридных клетках.

3. Получение гибридов путем слияния трех и более родительских клеток. Из таких гибридных клеток могут быть выращены растения (грибы) – регенераты.

4. Гибридизация клеток, несущих различные программы развития, – слияние клеток различных тканей или органов, слияние нормальных клеток с клетками, программа развития которых изменена в результате злокачественного перерождения. В этом случае получаются так называемые гибридомные клетки, или гибридомы, наследующие от нормальной родительской клетки способность к синтезу того или иного полезного соединения, а от злокачественной – способность к быстрому и неограниченному росту.

2.4. Основные понятия генетики

Если целевым продуктом производства служит не биомасса, а вещества, выделяемые клетками в среду, то используют генетически измененные штаммы, так как природные штаммы ограничены нейтральными механизмами от производства метаболитов.

Контрольные механизмы нарушаются, подвергая клетки мутациям или геноинженерным манипуляциям, при производстве вторичных метаболитов: аминокислот, витаминов, нуклеотидов, ферментов, органических кислот, антибиотиков, путь синтеза которых часто неясен, так как при этом в синтез вовлечены десятки генов, применяют мутанты и штаммы, сконструированные

методами генетической инженерии. Ценные производственные признаки комбинируются в одном штамме.

Создание штамма с рекомбинатной молекулой ДНК основано на том, что ДНК всех организмов однотипна, а ферменты, осуществляющие рекомбинацию лишены видовой специфичности, поэтому можно получить рекомбинатную ДНК из организмов любого происхождения. Метод позволяет эффективнее, чем с помощью других технологий, получить штамм с заданными свойствами.

2.5. Генетическая инженерия

Суть *генетической инженерии* состоит в том, что выделяют ДНК, ферментируют её, включают фермент ДНК в *вектор*, вводят в живую клетку, клонируют гены.

Векторами называют молекулы ДНК, способные переносить в клетку чужеродную ДНК, и обеспечить там её размножение – амплификацию. В качестве векторов используют *плазмиды*, вирусы животных, бактериофаги.

Для клонирования часто используют *плазмиды*, имеющие тестируемые маркеры, например гены, устойчивые к антибиотикам ампициллина и тетрациклина. Для клонирования чужеродных генов чаще всего используют клетки кишечной палочки (E. Coli), а в последнее время – сенной палочки.

На рисунке 2.1 представлен пример поэтапного конструирования штамма E. Coli методом генетической инженерии. В результате индуцированного мутагенеза и ступенчатого отбора (рис. 2.1) выход пенициллина у неидеального гриба удалось увеличить в 10 тыс. раз по сравнению с исходным (природным) штаммом. Мутации позволяют также избавляться от нежелательных антибиотиков и получить новые. Так, например, мутации Str. aureofaciens привели к образованию 6-димстил-хлортетрациклина и 6-диметилтетрациклина, выпускаемых в настоящее время промышленностью.

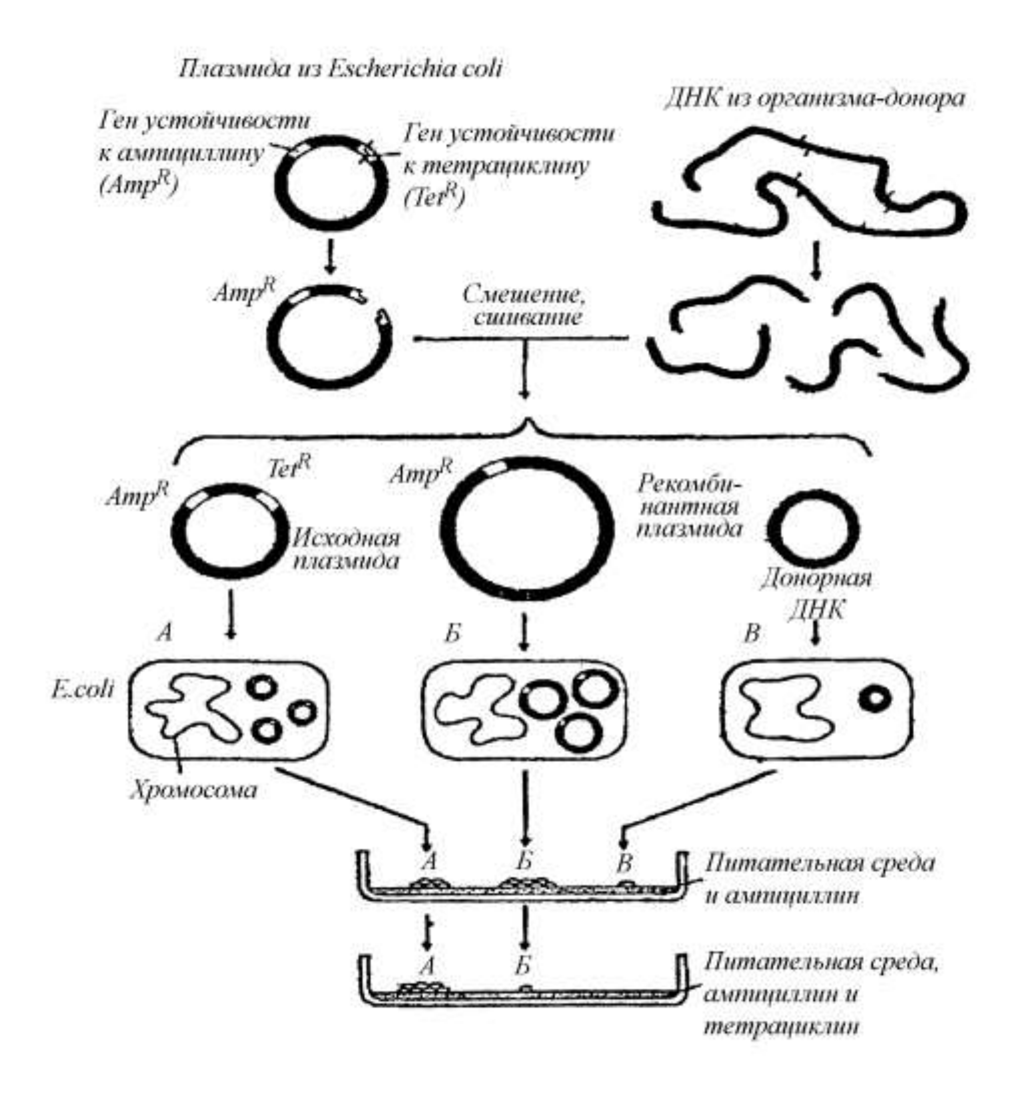


Рисунок 2.1 Этапы конструирования штамма E. Coli, несущего чужеродные гены из ДНК организма-донора

Они имеют большую стабильность к кислотам и щелочам, чем исходные пятилированные тетрациклы. В производстве рибофлавина применяют мутантный штамм дрожжеподобных грибов, синтезирующий в 2 тыс. раз больше витамина B_2, чем исходный. При производстве витамина B_{12} получено два бактериальных мутанта, образующих в 5 тыс. раз больше витамина, чем исходные природные штаммы.

В последние годы гены мицеллиальных грибов и антиполицетов, продуцирующих антибиотики, выделяют, идеалтифицируют и клонируют. Показано также, что многие гены дрожжей могут размножаться в бактериях.

Методами генетической инженерии пытаются вывести новые виды растений,

синтезируют макромолекулы, в частности белки (интерферон, саматостапии, урокипазу, инсулин, антибиотики и др.). Генетическая инженерия имеет большое практическое значение для биотехнологической промышленности. Она позволяет увеличить продуктивность штамма путем ампилификации генов или помещая ген под контроль “сильного” промотора. Можно придать организму новые для него свойства путем введения в клетку её собственных измененных или чужих генов. *Процесс введения измененных генов – это локализованный мутагенез*. Он позволяет повысить эффективность мутагенеза и свести к минимуму побочные действия мутагенов при обработке ими клеток in vitro.

Генетическая инженерия может помочь промышленности избавиться от серьезного бича – фаголизиса. Штаммы, сконструированные методами генетической инженерии, применяют при получении в промышленности белков человека.

2.6. Инженерия белка

Белковая инженерия основана на методах генетической инженерии, позволяющих получить модифицированные варианты природных белков.

Крупные успехи, достигнутые за последнее время в химическом синтезе ДНК, открыли перед белковой инженерией принципиально новые возможности: конструирование уникальных, не встречающихся в природе белков. Для этого необходимо дальнейшее развитие технологии так, чтобы изменение генов методами генетической инженерии приводило к предсказуемым изменениям белков, к улучшению их вполне определенных функциональных характеристик: числа оборотов (для контрольного субстата), термостабильности, температурного оптимума, стабильности и активности в неводных растворителях, субстратной и реакционной специфичности, потребности в кофакторах, оптимума pH, устойчивости к протеазам аллостерической регуляции, молекулярной массы, субъединичного строения. Обычно такого улучшения достигают с помощью мутагенеза и отбора, а в последнее время и иммобилизации. Для успешного конструирования конкретного типа белка необходимо выявить ряд основополагающих закономерностей, связывающих структурные особенности

белков, их желаемые свойства. Зная точную кристаллическую структуру молекулы изучаемого белка, можно идентифицировать те ее участки, которые следует направленно модифицировать для увеличения его каталитической активности. Такая модификация может состоять в изменении аминокислой последовательности белка. Для контролируемой модификации белка необходимо использовать методы генетической инженерии. Так, сайтспецифический мутагенез осуществляется следующим образом. Клонируют ген того белка, который интересует исследователей, и встраивают его в подходящий генетический носитель, затем синтезируют олигонуклеотидную затравку с желаемой мутацией, последовательность которой из десяти-пятнадцати нуклеотидов в достаточной степени гомологична определенному участку природного гена и поэтому способна образовывать с ним гибридную структуру. Эта синтетическая затравка используется полимерами для начала синтеза комплементарной копии *вектора*, которую затем отделяют от оригинала и используют для контролируемого синтеза мутантного белка.

Альтернативный подход основан на расщеплении его синтетическим аналогом с желаемой последовательностью нуклеотидов.

РАЗДЕЛ 3. ИНЖЕНЕРНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ. ИММОБИЛИЗИРОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ

3.1. Основы энзимологии. Микроорганизмы как источники ферментов

Для производства некоторых аминокислот применяют энзиматический способ. Начало этим работам положили исследования японских ученых по получению аспарагиновой кислоты.

Энзиматический синтез может происходить в одну ступень с участием одного фермента или многих ферментов. Так, например, при энзиматическом способе получения L-цистеина участвует несколько ферментов.

Большая часть ферментов для энзиматических способов выделена из микроорганизмов. Высокая потребность в аминокислотах сильно стимулирует их производство, которое бурно развивается.

Ферменты катализируют образование и расщепление различных соединений, но в промышленности используют главным образом гидролитические ферменты для разложения биополимеров: крахмала, белков, целлюлозы и других.

Ферменты привлекают к себе все большее внимание и особенно в медицине и пищевой промышленности.

Это связано с тем, что ферменты обладают несомненными преимуществами, по сравнению с химическими катализаторами: 1) высокой скоростью и эффективностью действия в мягких условиях (низкое давление, температура и pH водных растворов); 2) отсутствием токсичности и легкостью прекращения реакции мягкой обработкой; 3) высокой субстратной специфичностью, исключающей побочные реакции. Химический синтез ферментов в больших масштабах дорог и пока нецелесообразен. Ферменты получают из растений, тканей и органов животных, но больше всего – из микроорганизмов.

Большой интерес к микроорганизмам как источникам получения ферментов объясняется легкостью, с которой удается получить большое, количество ферментов путем изменения окружающих условий и с помощью генетических манипуляций. Можно в 1000 раз увеличить уровень катаболитных и в несколько сот раз уровень биосинтетических ферментов.

Можно выделить следующие технологические преимущества использования микроорганизмов в качестве источника ферментов:

1. Экономичность выращивания микробных клеток в больших масштабах в связи с применением недорогих сред и быстрым ростом микроорганизмов.

2. Огромное разнообразие реакций, к которым способны микроорганизмы, особенно при получении вторичных метаболитов.

3. Микроорганизмы служат источниками не только таких ферментов, которые встречаются у растений и животных, но и ряда уникальных ферментов, нигде более в природе не обнаруженных. К числу их можно отнести танназу, целлюлазу, каратиназу, гидрогеназу и т.д.

Среди микроорганизмов встречаются формы, растущие при 87 °С и выше (350 °С) – потенциальные источники очень ценных для биотехнологии

термоустойчивых ферментов.

4. Способность микроорганизмов адаптироваться к различным окружающим условиям, что позволяет переносить культуру из природы на производство, где она может расти на дешевых источниках углерода и азота и давать ценные продукты.

На практике применяются в основном внеклеточные ферменты. Из внутриклеточных используют лишь несколько: глюкозоизомеразу, инвертазу, лактазу, глюкозооксидазу. Из известных в природе более 2000 ферментов сегодня в промышленности получают менее 50. В табл. 3.1 приведены промышленные ферменты и микроорганизмы-продуценты.

Таблица 3.1 – Наиболее важные промышленные ферменты и микроорганизмы-продуценты

Ферменты	Источник
α-амилаза	Asp. Oryzae, Bac. Amyloliquifaciens, (Bac. subtilis) Bac. licheniformis
β-глюканаза	Asp. Sp., Bac. Amyloliquefaciens
Глюкозоизомераза	Bac. Coagulans, Arthrobacter sp., Actionoplanes missouriensis, Streptomyces sp.
Глюкозооксидаза	Asp. Sp. Penicillium sp.
Целлюлаза	Asp. Sp. Trichoderma reesei (T. Viride)
Декстраназа	Pen. Sp.
Глюкоамилаза (амилоглюкозидаза)	Asp. Niger, Endomyces fibuliger, Rhizopus sp.
Лактаза	Asp. Niger. Kluyveromyces fragilis, Kl. lactis.
Мутаназа	Trichoderma harzianum
Пектиназа	Asp. Sp., Rhizopus sp.
Нейтральная протеаза	Asp. Sp., Asp. Oryzae, Bac. Amyloliquefaciens, Rhizopus sp.
Щелочная протеназа	Bac. Lichenifonnis, Bac. Thermoproteolyticus, Bacillus - алкалофильный вид.
Микробный реннин (протеаза)	Endothia parasitica, Mucor miehei, Mucorpussilus
Пуллуланаза	Klebsiella aerogenes

3.2. Получение ферментов. Выбор штамма и условий культивирования

Промышленное производство и применение ферментов основано на двух прототипах: 1) ферменты образуют живые клетки; 2) они могут проявлять свое специфическое действие в среде независимо от живых клеток.

При первоначальном выделении штамма исходят из того, что микроорганизмы адаптируются к утилизации субстрата, находящегося в изобилии в местах обитания, а поэтому образуют ферменты, реагирующие с этим субстратом.

Например, продуценты целлюлаз и лигнолитических ферментов выделяют из лесных почв, продуценты пектиназ – из фруктов и растений, а деструкторы мочевой кислоты – из почвы птичьего загона и т.д. Ферменты близкородственных штаммов имеют сходные свойства, а у дальнородственных могут сильно отличаться.

Технологический процесс получения ферментов можно разбить на несколько ступеней: 1) селекция организма, образующего данный фермент в наибольшем количестве, при этом желательно образование внеклеточных ферментов; 2) получение высоких выходов ферментов за короткое время; 3) очистка продукта из культуральной жидкости или экстракта, которая должна производиться по возможности легко; 4) штамм не должен продуцировать антибиотики и токсические вещества, а также быть родственником штаммов, образующих токсины.

В основном ферменты, используемые в промышленности, относятся к индуцибельным и репрессибельным. Для увеличения выхода (сверхсинтез) с ферментами проводят различные манипуляции, связанные с изменением окружающих условий роста или ведущие к изменению генетического кода. Генетические манипуляции включают в себя классические методы получения мутантов и технику генетической инженерии.

Для получения индуцибельных ферментов процесс культивирования ведут в присутствии индуктора. Индукция – универсальный контроль для катаболических путей, происходит при взаимодействии сигнального метаболита (индуктора) с белком – репрессором, который в свою очередь может блокировать инициацию

транскрипции генов. Типичные индукторы – это субстраты: крахмал для амилаз; сахароза для инвертазы; лактоза для β-галоктозидазы.

Биосинтетические ферменты часто репрессируются конечным продуктом. Чтобы избежать катаболитной репрессии, в среду не вносят репрессирующий источник углерода и работают с мутантами, устойчивыми к катаболитной репрессии. Так как ферменты являются непосредственными продуктами генов, их продукцию увеличивают, вводя множество копий генов с помощью плазмид или трансдуцирующих фагов. Можно также включать сильные промоторы в ДНК и усилить экспрессию генов.

3.3. Культивирование микроорганизмов в промышленности

Для получения ферментных препаратов микроорганизмы культивируют двумя способами: поверхностным с использованием твердых субстратов и погруженным (глубинным). Твердофазное культивирование играет важную роль для получения ферментов из грибных источников.

Глубинное культивирование ведут периодическим методом в течение 10 – 80 ч. При известных оптимальных условиях процесса применяют проточное культивирование. Если оптимальные условия для роста и синтеза ферментов различаются, то используют двустадийную проточную систему. В первом ферментаторе в оптимальных условиях выращивают культуру, а во втором убирают или снижают концентрацию репрессора, и промытые после первой стадии выращивания клетки продолжают культивировать для накопленного фермента. В промышленном масштабе известен только один фермент, который получают при проточном культивировании микроорганизмов – глюкозоизомераза и Bac. Coagulans. Лимитирующими факторами служат кислород и глюкоза. Максимальная продуктивность обычно сохраняется более 200 ч.

Для процесса необходима аэрация, поэтому требуется хорошее перемешивание. Следующие этапы производства: выделение, очистка и перевод в хранящуюся форму. Ферменты, образованные при культивировании микроорганизмов на твердом субстрате (внеклеточные), экстрагируют водой. Вода может содержать соли, буфер или другие вещества, обеспечивающие

растворение ферментов и излучающие их стабильность в растворе. При погруженном культивировании и выделении ферментов в среду имеем очень неблагоприятное соотношение между количеством культуральной жидкости и выходом продукта. Следовательно, требуется предварительное концентрирование жидкости с помощью методов, щадящих белки (например, ультрафильтрация через полупроницаемые мембраны). Вначале отделяют грубые частицы путем декантации либо центрифугированием. Полученный частично коллоидный материал трудно осадить, поэтому к раствору добавляют химические вещества и флокулянты, облегчающие осаждение. После коагуляции тонких частиц их удаляют центрифугированием или фильтрацией. Раствор ферментов концентрируют под вакуумом или ультрафильтрацией при температуре не выше 30–35 °С. При ультрафильтрации удаляется не только вода, но и низкомолекулярные соединения. От микроорганизмов раствор освобождают пропусканием его через целлюлозный или асбестовый фильтр.

В зависимости от области применения возможна различна степень биотики. Некоторые ферментные препараты выступают в виде высушенных отрубей с мицелием грибов, высушенных осадков белков или высушенных растворов.

Для хранения ферментов очень важен перевод их в специальную для этого форму, что особенно необходимо для хранения растворов ферментов. Чаще всего в качестве стабилизаторов используют соли Са или Mq, белки, гидролизаты крахмала, сахара и сахарные спирты, манит или сорбит, NaCl, бензоаты, сорбенты. Ферментные препараты хранят при низких температурах и соответствующем значении pH.

В качестве примера получения и использования ферментативных процессов можно привести работы, в которых выделен из сточных вод очистных сооружений ЦБК штамм гриба – продуцент белка и целлюлаз. Традиционно отходы и побочные продукты деятельности в области сельского хозяйства, лесной и пищевой промышленности утилизируют, сжимая или закапывая в землю. Однако возросшая стоимость транспортировки, уменьшение площади бросовых земель и проблемы окружающей среды требуют поиска новых способов

утилизация этих отходов.

В настоящее время отходы растениеводства широко используются для производства белка, спирта и ферментных препаратов.

Питательная ценность биомассы, полученной в результате микробиологической конверсии отходов, по жировому и белковому содержанию позволяет использовать её в качестве кормовой добавки для моногастричных животных.

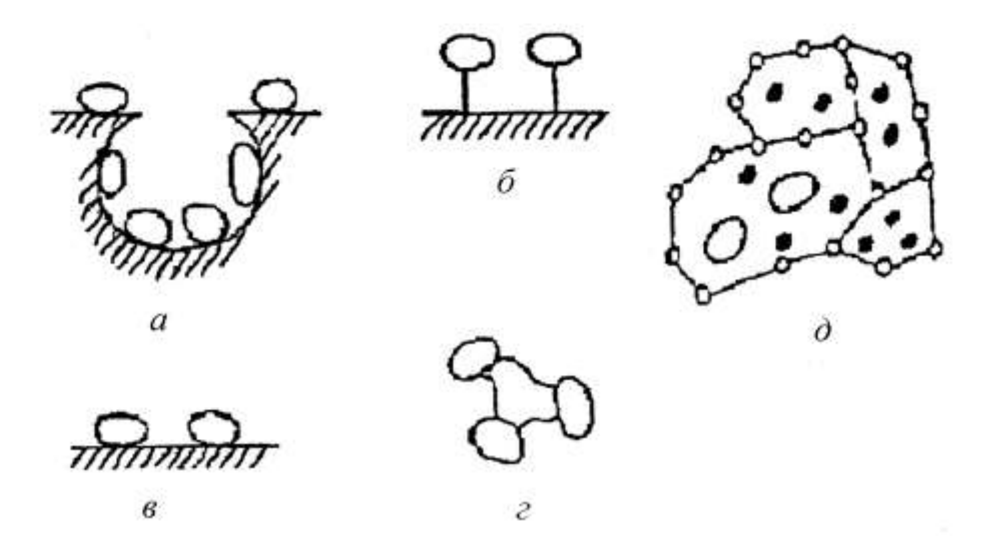
Для микробиологической ферментации растительных отходов используют микроорганизмы различных таксономических групп, которые способны утилизировать различные растительные субстраты: солому, багассу, картофельные очистки, банановую кожуру, стружки зеленых бобов, манговую кожуру, мякоть, корки и косточки мандаринов, отходы производства бумаги (скоп).

3.4. Иммобилизация биокатализаторов и другие новые технологии

Сегодня ферменты применяются наиболее широко для превращение углеводов, играющих особую роль в пищевой и молочной промышленности. Так, лактазу применяют для гидролиза лактозы в снятом молоке. Получаемый безлактозный продукт используется теми людьми, организм которых не способен синтезировать лактозу. Этот фермент применяется, кроме того, для переработки лактозы сыворотки в имокозолактозные сиропы, а также подкисленной сыворотки, образующейся при получении творога.

Под действием инвертазы из сахарозы получают глюкозу. Для определения количества глюкозы в жидкости тела в клиниках в последнее время стала широко использоваться глюкозооксидаза – как в свободной форме, так и иммобилизированная.

Иммобилизированные биокатализаторы – это ферменты, клетки или органеллы (или их комбинации) которых находятся в состоянии, допускающем их повторное использование. Существует 5 основных способов иммобилизации ферментов (рис. 3.1).



а – адсорбция на крупнопористом носителе; *б* – ковалентное связывание; *в* – адсорбция; *г* – поперечная сшивка; *д* – включение в полиакриламидный гель

Рисунок 3.1 Схема различных методов иммобилизации клеток микроорганизмов

Адсорбция на нерастворимом носителе (на стеклянных бусах, керамике, частицах целлюлозы, активированном угле и т.д., см. рис. 3.1, *а*).

Ковалентное присоединение к нерастворимому носителю, например к гидроксидам металлов (см. рис. 3.1, *б*).

Включение в нерастворимый водопроницаемый полимер, например в крахмал, коллаген, силикагель, каррапинан, полиуретан (см. рис. 3.1, *в*).

Помещение фермента в полупроницаемую мембрану (в полые волокна ацетата целлюлозы, см. рис. 3.1, *г*).

Придание нерастворимости ферменту путем его поперечного связывания с бифункциональным агентом, например, глутаровым альдегидом (см. рис. 3.1, *д*).

Иммобилизированные ферменты имеют следующие преимущества перед свободными: их можно использовать многократно, они часто более стабильны и в большей степени приспособлены для проточного применения. За последние 20 лет ферментная промышленность выросла на два порядка, благодаря разработке погруженных ферментных процессов и методов иммобилизации.

Сегодня в промышленности реализовано всего четыре крупномасштабных технологии на основе иммобилизированных ферментов (глюкозоизомеразы,

аминоацилазы, пенициллиноацилазы и лактазы). Последнюю иммобилизировали на частицах кремнезема и применяли для конверсии лактозы сыворотки в глюкозу и галактозу.

В обозримом будущем иммобилизированные ферменты могут быть использованы для следующих целей.

1. Холинэстераза может применяться для определения пестицидов. Степень ингибирования этого фермента в присутствии пестицидов оценивают электрохимическими и колориметрическими методами.

2. Аналогичным образом другие ферменты могут использоваться для определения токсических веществ. Так, карбоангидраза очень чувствительна даже к малым концентрациям хлорпроизводных углеводородов, гексокиназа – к хлордану, линдану и токсафену.

3. Иммобилизованная диизопропилфторфосфотаза нервных клеток кальмара может найти применение для обезвреживания фосфоорганических нервных газов (зомана, зарина).

4. Иммобилизованная гепариназа может применяться для предотвращения тромбообразования в аппаратах искусственного кровообращения.

5. Иммобилизованная билирубиноксидаза может использоваться для удаления билирубина из крови новорожденных, страдающих желтухой.

6. Предложен новый способ применения иммобилизованного гемоглобина. Суть его состоит в том, что включенный в полиуретановую матрицу белок образует “гемогубку”, способную поглощать кислород прямо из воды с эффективностью 80 %. Далее кислород высвобождается из полимера под действием слабого электрического разряда или в вакууме. Предполагается, что такая система может снабжать кислородом водолазов либо работающие под водой двигатели.

7. Возможно, вскоре удастся создать системы из нескольких иммобилизованных ферментов. Так, если заключить в микрокапсулы три фермента – уреазу, глутаматдегидрогеназу и глюкозодегидрогеназу, то их можно будет использовать для удаления мочевины из крови больных с почечной

недостаточностью.

8. Иммобилизованные ферменты найдут дальнейшее применение в молочной промышленности. При производстве сыра могут использоваться иммобилизованные свертывающие молоко белки – реннин и пепсин. Для гидролиза жира в молоке можно использовать иммобилизованные липазы и эстеразы.

9. Разнообразные иммобилизованные ферменты со временем найдут применение и в датчиках для быстрого анализа. Сегодня в таком качестве используется лишь несколько ферментов, но когда будет решена проблема стабилизации, их число увеличится. Особенно полезными из-за их высокой стабильности могут оказаться ферменты термофилов.

Другой пример: с помощью иммобилизованных ферментов, работающих в малофазных системах, в органических растворителях собираются осуществить органический синтез липидов, жиров из нефтехимических продуктов. В 2-х фазных системах (вода – органический растворитель) выход продукта может существенно превышать его выход для каждой из фаз в отдельности. Изменяя соотношение между объемом фаз, можно сдвигать положение химического равновесия в сторону продукта или исходных веществ. Такие системы создают эмульгированием водного раствора фермента в органическом растворителе или суспендирования пористых частиц, пропитанных водным раствором фермента.

РАЗДЕЛ 4. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОИЗВОДСТВА, ТИПОВЫЕ СХЕМЫ ПРОЦЕССОВ ПОЛУЧЕНИЯ ВАЖНЕЙШИХ ПРОДУКТОВ БИОТЕХНОЛОГИИ

4.1. Бродильное производство растворителей

К числу важных бродильных производств относится получение ацетона и бутанола. Впервые, в промышленном масштабе они были получены в Манчестере Вейсманном в ходе первой мировой войны. Ацетон был необходим для производства кордита и как метательное взрывчатое вещество в тяжелой артиллерии. До начала военных действий его импортировали из Германии.

Ацетон низкого качества получали путем сухой перегонки древесины, но для упомянутых целей нужен был высококачественный растворитель.

Бродильный процесс (ферментация) был основан на переработке крахмала, концентрация которого составляла до 3,8 % (мас./объем), анаэробными спорообразующими бактериями *Clostridium acetobutylicum.* Превращению подвергалось до 30 % субстрата, в результате чего получалась смесь растворителей (60 % бутанола, 30 % ацетона, 5 – 10% этанола, изопропанола и мезитилоксида). Остальная часть субстрата в ходе процесса, представленного на рис.10, превращалась в водород и углекислый газ.

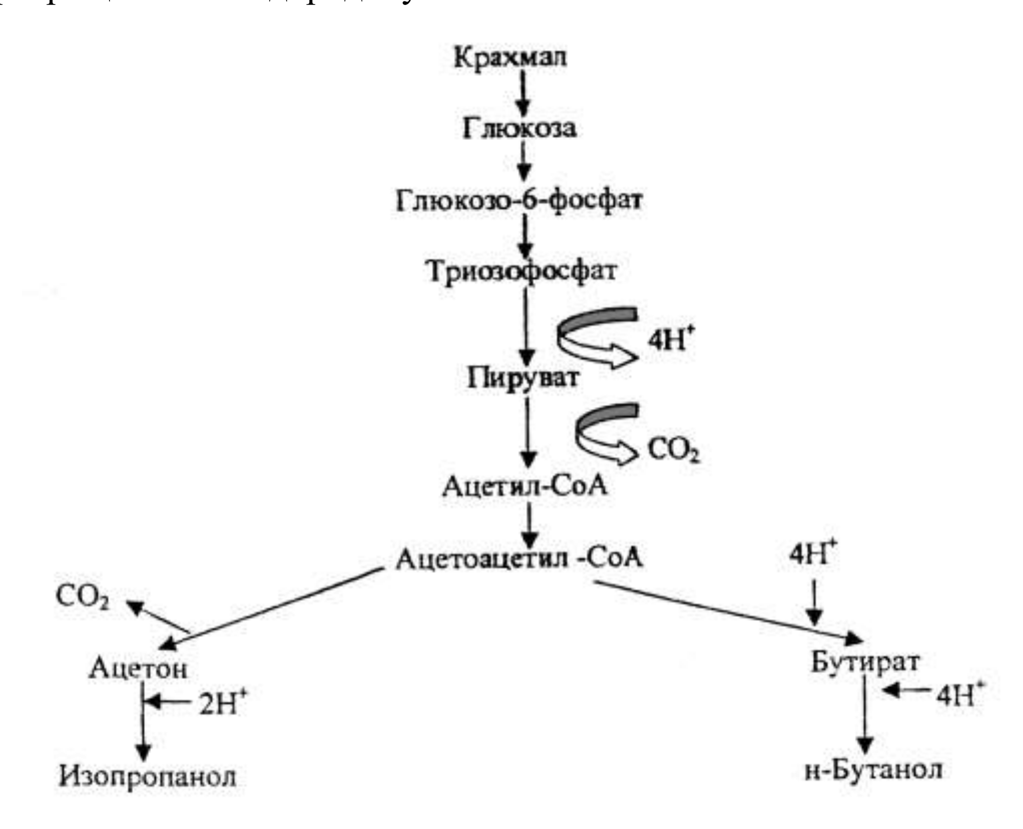


Рисунок 4.1 Схема реакций ацетон-бутанольного брожения

Поскольку образовывались большие объемы газов, при крупномасштабном производстве перемешивания не требовалось, а главная сложность заключалась в гашении пены. В зависимости от штаммов отношение “ацетон: спирт” несколько варьировало. Многие микробы, разрушающие крахмал и способные образовывать растворители, могут также сбраживать мелассу при содержании сахара в среде до 6 % (мас./объем). Фактором, определяющим количество использованного

субстрата, оказалась чувствительность организмов, участвующих в процессе, к н-бутанолу (верхний предел – около 1,2 % по объему) и ацетону (0,4 %). Заражения бродильных емкостей аэробными бактериями обычно не происходило, и главной проблемой была инфекция бактериофагами. Впоследствии выяснилось, что участвующие в процессе микроорганизмы можно “иммунизировать” путем нескольких пересевов в присутствии бактериофага. Было установлено, что фаговая инфекция является штамм-специфичной.

Растворители отделяли от среды отгонкой. В конце первой мировой войны главную роль стало играть производство бутанола: он нашел применение при получении широкого круга веществ, включая мочевиноформальдегидные пластмассы, пластификаторы и тормозные жидкости. Побочный продукт, водород, стал использоваться в производстве синтетического метанола и для гидрогенизации пищевых масел; углекислый газ либо сжижали, либо превращали в сухой лед. Твердые вещества отходов содержали большое количество рибофлавина (витамина B_2), и их можно было использовать как богатую белком добавку к кормам.

После второй мировой войны бродильное производство этих растворителей, однако, сильно сократилось, так как относительная стоимость нефтехимических продуктов по сравнению с полимерами сахаров уменьшилась. Производство н-бутанола путем ферментации продолжалось лишь в ЮАР. Однако в настоящее время получение бутанола с помощью ферментации становится все более выгодным, и очень может быть, что методами генетической инженерии удастся создать такие микроорганизмы-продуценты, применение которых перетянет чашу весов в сторону этого способа. Главный недостаток существующих штаммов – низкая устойчивость к конечным продуктам и относительно низкий выход растворителей.

В ходе второй мировой войны активно исследовалась возможность получения бутилен-2,3-гликоля, в последнее время к этому процессу микробиологической конверсии также проявляется интерес. Одной из проблем молочной промышленности является использование сыворотки. Между тем она может быть

источником углерода при образовании бутиленгликоля бактериями *Klebsiella pneumoniae* или *Enterobacter aerogenes,* который превращают затем в сырье для производства синтетического каучука.

4.2. Производство органических кислот

Среди органических кислот самая важная – уксусная. На рынок США ее ежегодно поступает около 1,4 млн. т общей стоимостью до 500 млн. дол. (без учета уксуса). В прошлом основную часть уксусной кислоты получали путем микробиологического окисления этанола, но сегодня, за исключением производства уксуса, этот процесс по экономическим соображениям не применяется. Впрочем, в результате ведущихся исследований термофильных бактерий, способных превращать целлюлозу в уксусную кислоту, а также штаммов *Acetobacter* и *Clostridium,* способных синтезировать ее из водорода и углекислого газа, этот метод, может быть, восстановит свои позиции. Техническая уксусная кислота используется при выработке многих химических веществ, включая каучук, пластмассы, волокна и инсектициды. При обычном способе производства микробиологическая конверсия этанола в уксусную кислоту при участии штаммов *Acetobacter* и *Clostridum* идет в аэробных условиях, и поэтому, строго говоря, не является процессом брожения. Уксус по праву считается важнейшим продуктом микробиологической промышленности.

В конце XIX в. началось промышленное производство молочной кислоты при участии молочнокислых бактерий *Lactobacillus delbrueckii, L. Leishmannii* и *L. Bulgaricus.* Это был один из первых процессов, где применялась частичная стерилизация среды нагреванием. Этот микроаэрофильный процесс осуществляется при высокой температуре (45 – 50 °С). В нем используют содержащее крахмал сырье, которое предварительно обрабатывают ферментами или подвергают кислотному гидролизу. *L. Bulgaricus* активно сбраживает лактозу и может поэтому использовать молочную сыворотку в качестве питательного субстрата. В других случаях конверсии подвергается сахароза (концентрация 12 – 18 %, мас./объем). Процесс идет 3 – 4 сут, при этом в больших количествах выделяется углекислый газ, что облегчает создание в среде оптимальных

полуаэробных условий. Описаны также способы конверсии 1,2-пропандиола в молочную кислоту при помощи *Arthrobacter oxidans, Alcaligenes faecales* или *Fusarium solani* Эти микроорганизмы в основном образуют L(+)-изомер молочной кислоты, но некоторые штаммы *L. Leishmannii* синтезируют D(-)-изомер. Было изучено образование молочной кислоты при непрерывном культивировании. В одностадийном процессе выход в случае *L. delbrueckii* составлял 89 г/л в сутки. При использовании препаратов молочнокислых бактерий, иммобилизованных в альгинатных гелях, степень конверсии достигала 97 %. Доля L(+)-изомера составляла 90 %, а время полужизни – 100 сут. В этих процессах молочную кислоту получают в форме кальциевой соли; чтобы выделить конечный продукт, ее обрабатывают серной кислотой. Молочную кислоту используют в качестве добавки к безалкогольным напиткам, эссенциям, фруктовым сокам, джемам и сиропам, для декальцификации кож в дубильной промышленности, а также при производстве пластмасс, когда L(+)-форму полимеризуют в полилактат, применяемый для производства пластиковых оберток. Соли молочной кислоты используются в медицине.

Производство лимонной кислоты методом ферментации при участии грибов (рис. 4.2) также принадлежит к числу давних биотехнологических процессов; оно было налажено в 1893 г.

Его развитие шло в тесной связи с разработкой многих фундаментальных аспектов микробиологии. Вначале основные проблемы были связаны с микробным загрязнением. В поисках их решения было найдено, что процесс можно вести при очень низких pH, это почти не сказывается на образовании кислоты грибами. В таких условиях создавать и поддерживать стерильность гораздо проще. За 1 – 2 недели ферментации при высоких концентрациях сахара в сырье выход достигал 60 %. Наибольший выход получали, когда тем или иным способом ограничивали рост мицелия.

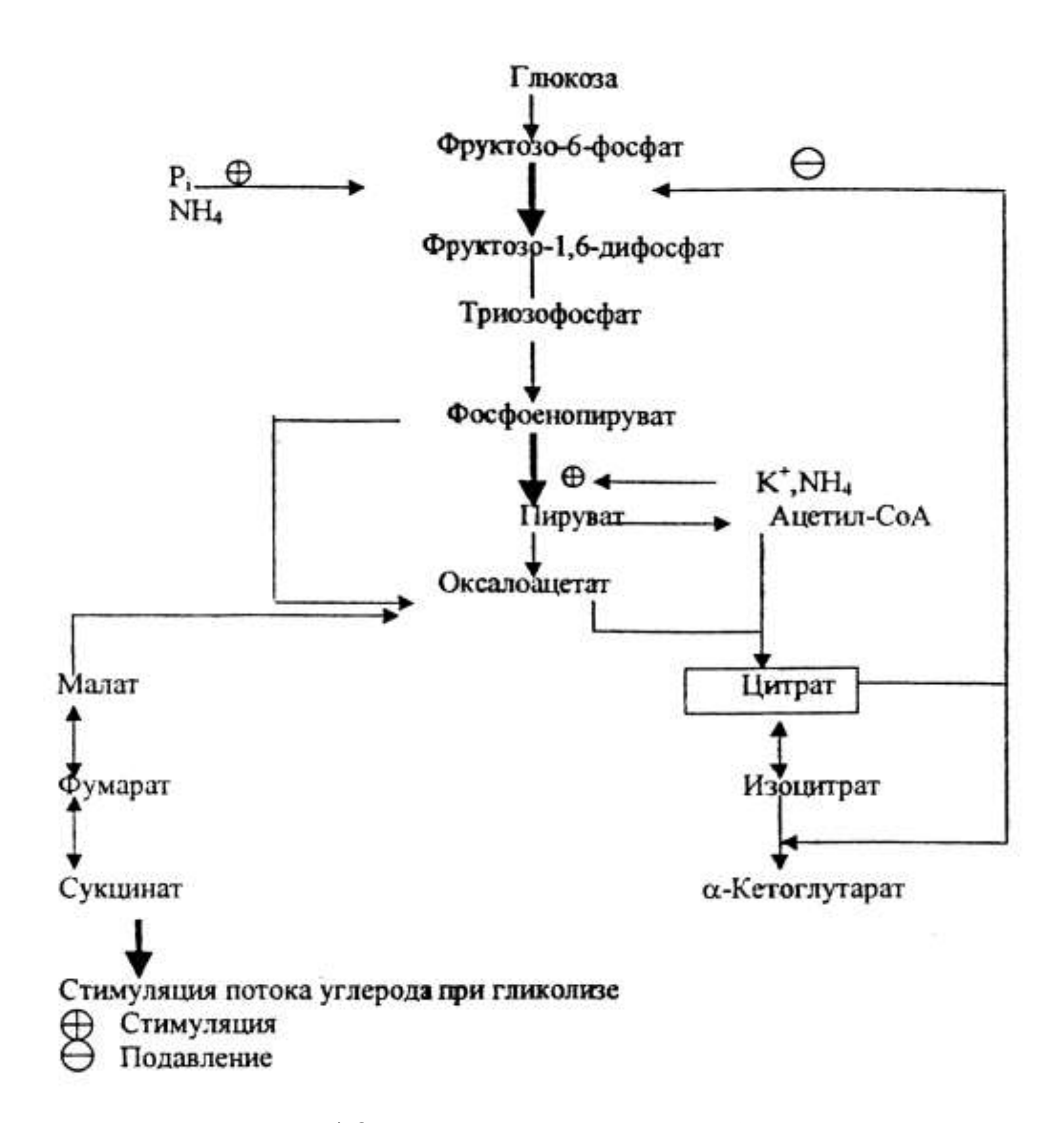


Рисунок 4.2 Производство лимонной кислоты

Первоначальный вариант процесса основывался на поверхностной ферментации, но в 1950 г. было внесено важное изменение – освоено глубинное культивирование. Было показано, что стабильный процесс глубинной ферментации возможен только в том случае, если он осуществляется в две стадии: на первой идет рост мицелия, а на второй (в несодержащей фосфор среде) – образование лимонной кислоты. За короткий срок были разработаны схемы, основанные на использовании дешевого углеводного сырья: мелассы, крахмала и глюкозного сиропа. Наличие ионов металлов в исходном сырье приводит к резкому падению выхода; их нужно удалять либо путем осаждения гексацианоферратом, либо пропусканием через ионообменные смолы, либо применением солей четвертичного аммония. Для устранения вредного влияния

этих примесей широко используется также метанол и другие низшие спирты. Механизм их действия неизвестен. Возможно, они как-то влияют на цитоплазматическую мембрану. В 60-х годах для производства лимонной кислоты был предложен новый процесс на основе н-парафинов (C_{9-30}) и штаммов *Corynebacterium, Arthrobacter* и *Brevibacterium*, но рыночной продукции с его помощью получено не было. Изучалось также образование лимонной кислоты дрожжами *Candida*. Они синтезируют смесь лимонной и изолимонной кислот в соотношении, зависящем как от генетических факторов, так и от условий ферментации. Было найдено, что ключевую роль здесь играет аконитат-гидролаза: мутанты с малой активностью этого фермента продуцировали больше лимонной кислоты. Растущие на углеводородах дрожжи также способны синтезировать лимонную кислоту из глюкозы. Гриб *Trechoderma viride* образует большое количество цитрата из глюкозы; это позволяет вырабатывать лимонную кислоту из целлюлозы. С помощью некоторых видов *Ptnicillium* можно вести ферментацию с образованием L_5-алло-изолимонной кислоты, диастереомера изолимонной кислоты.

В промышленном производстве лимонной кислоты в основном используется *Aspergillus niger*, но применяется также и *A. wentii*. Процесс ферментации очень сложен, так как лимонная кислота является продуктом первичного метаболизма этих грибов, и любое сколько-нибудь существенное выделение этого промежуточного соединения обмена веществ в окружающую среду свидетельствует о сильном нарушении метаболизма, возникающем вследствие его дисбаланса или генетических нарушений. Рост грибов обычно регулируют путем изменения состава среды (P, Mn, Fe, Zn). Субстрат должен легко усваиваться; негидролизованные полимеры обычно не используют, так как в этом случае внеклеточный гидролиз будет лимитировать скорость всего процесса.

Сверхпродукция лимонной кислоты является ответной реакцией на недостаток фосфата, но при выраженной нехватке металлов лимитирующим фактором не обязательно является фосфат. Роль металлов при этом до конца еще не понята. Оптимум pH составляет 1,7 – 2,0; в более щелочной среде происходит

образование заметных количеств щавелевой и глюконовой кислот. Таким образом, тщательный контроль за культуральной средой позволяет обойти регуляторные системы обмена и создает оптимальный фон для образования лимонной кислоты. Видимо, в этих условиях стимулируется гликолиз и обеспечивается неограниченное поступление углерода в реакции промежуточного метаболизма. Уровень накопления цитрата зависит при этом от поступления оксалоацетата.

При недостатке марганца активность ферментов цикла трикарбоновых кислот уменьшается, что в свою очередь подавляет анаболизм. Такое нарушение обмена приводит к повышению концентрации аммонийных ионов внутри клеток, и они могут смягчать ингибнрующее влияние цитрата на фосфофруктокиназу. Кроме того, марганец видимо, как-то влияет на биохимические свойства поверхности клеток и морфологию гиф. Поскольку в процессе потребляется много кислорода, возможно повторное окисление цитоплазматического NADH без образования ATP. В нем участвует альтернативная, а не основная цепь дыхательных реакций. В результате без сколько-нибудь выраженного изменения обмена возникает метаболическая “утечка” (flux) через гликолиз. Эта утечка, происходящая при участии конститутивной пируваткарбоксилазы и некоторых ферментов цикла трикарбоновых кислот, а также необычная кинетика действия ферментов, участвующих в метаболизме оксалоацетата, приводят к увеличению внутриклеточной концентрации цитрата. Последний способствует дальнейшему накоплению цитрата путем ингибирования изоцитратдегидрогеназы.

В промышленном производстве лимонной кислоты применяется несколько вариантов процесса. Традиционным твердофазным вариантом является процесс Коджи; он имеет много общего с процессом поверхностной ферментации. Глубинная ферментация с технической точки зрения сложнее, чем поверхностная, но возможна в разных вариантах: периодическом с подпиткой и непрерывном. Периодическая ферментация используется при работе с глюкозосодержащими субстратами, а ее вариант с подпиткой чаще применяется при переработке мелассы. Непрерывное культивирование, дающее наибольший выход продукта,

также возможно, но применение этого способа в промышленности в обозримом будущем маловероятно. Для процесса характерно два максимума скорости: роста и образования продукта. На первом этапе образуется значительное количество продукта, зависящее от скорости роста. На втором этапе рост отсутствует, а предельное количество образующегося продукта определяется концентрацией биомассы. В конце ферментации массу мицелия отделяют фильтрованием и промывают. Затем ври $pH<3,0$ осаждают щавелевую кислоту в форме оксалата кальция. Богатый белком мицелий можно использовать на корм скоту. Лимонную кислоту осаждают из жидкой фазы в форме кальциевой трехзамещенной соли в комплексе с четырьмя молекулами воды. Осадок отфильтровывают, промывают и свободную кислоту получают путем обработки сульфатом кальция. Далее ее очищают при помощи активированного угля и ионообменных смол. Можно также экстрагировать кислоту растворителем.

У лимонной кислоты приятный кислый вкус, она хорошо растворима в воде. Ее широко используют в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности. Эфиры лимонной кислоты применяются в производстве пластмасс. Поскольку лимонная кислота связывает (хелатирует) металлы, ее используют для их очистки. В составе детергентов она легко разрушается живыми организмами, и ею заменяют фосфаты.

Процессы, основанные на микробиологической ферментации, разработаны и для получения ряда других органических кислот. Среди них – глюконовая кислота и ее производные, яблочная, виннокаменная, салициловая, янтарная, пировиноградная и соевая кислоты. Хотя некоторые из них и поступают на рынок, в нынешних условиях в большинстве случаев такое производство экономически невыгодно.

D-глюконовая кислота и ее δ-лактон представляют собой простые продукты окисления (дегидрогенизации) глюкозы. Еще в начале 20-х годов было налажено промышленное производство этой кислоты из глюкозы при участии *Aspergillus niger*. Нейтрализация кислоты позволяла получать большой выход продукта. В погруженных культурах за 48 ч конверсия субстрата составляла 90 %.

Исследования на полупромышленных установках показали, что если ферментацию вести при повышенном давлении, то выход кислоты за 24 ч составляет 95 % от теоретического при использовании раствора глюкозы с концентрацией 150–200 г/л. Процесс можно вести в полунепрерывном режиме, заново используя мицелий (до девяти раз подряд). Более того, концентрацию глюкозы можно довести до 350 г/л, если для удаления кислоты использовать комплексообразование с соединениями бора и получать бороглюконат кальция. Однако для осуществления этого процесса нужны особые, устойчивые штаммы. От него отказались после того, как было выяснено, что эта соль неблагоприятно влияет на кровеносные сосуды животных. Контроль за pH осуществляли путем добавления углекислого кальция либо едкого натра.

4.3. Микробное выщелачивание

4.3.1. Выщелачивающие микроорганизмы

Методы извлечения меди из пород, содержащих минералы, путем обработки их кислыми растворами используются уже много веков. Однако в 50-е и 60-е гг. XX столетия выяснилось, что в получении металлов из минералов решающую роль играют бактерии. В 1947 г. Колмер и Хинкл выделили из шахтных дренажных вод бактерию *Tiobacillius ferrooxydans.* Этот организм окислял двухвалентное железо и восстанавливал серосодержащие соединения, а также, возможно, и некоторые металлы. Вскоре оказалось, что он участвует и в переводе меди из рудных минералов в раствор.

Сейчас известны и другие микроорганизмы, активно участвующие в извлечении металлов из минералов; большинство минералов сульфидной природы разрушается именно этим путем. Хотя технология бактериального выщелачивания используется в основном для извлечения меди и урана, она находит достаточно широкое применение и в переработке минерального сырья.

В данном разделе рассматриваются организмы, участвующие в выщелачивании металлов, и механизмы их действия. Описаны сферы применения микробного выщелачивания в настоящем и возможное будущее биоэкстрактивной металлургии.

В бактериальном выщелачивании участвуют следующие микроорганизмы.

Tiobacillis ferrooxydans

Этот наиболее изученный из всех выщелачивающих организмов почти всегда можно выделить из среды, в которой происходит окисление железа или минералов. *T. ferrooxydans*, вероятно представлен в различных природных средах штаммами с температурными оптимумами от 10 до 30 °С. Максимальная переносимая температура равна 37°С.

Leptospirillium ferrooxydans

Этот организм, который, видимо, лучше называть *Ferrovibrio*, впервые был выделен в Армении, однако теперь известно, что он встречается во многих местах, где осуществляется выщелачивание. Он может расти при 40 °С и pH 1,2 на пирите FeS_2 и, по-видимому, окисляет только железо, не затрагивая серу. Этим он отличается от *T. ferrooxydans,* который окисляет серу так же хорошо, как железо.

Thiobacillus thiooxydans, T. acidophilus и T. organoparus

Эти ацидофильные организмы окисляют только серу и ее соединения, а также действуют на серу пирита совместно с *Leptospirillium ferrooxydans.* Они могут участвовать в окислении серы, образующейся в результате химической реакции между ионами трехвалентного железа и сульфидами меди. *T. thiooxydans* изменяет pH среды, в которой он растет, до значительно меньших величин (≈0,65) чем те, которые переносит хорошо охарактеризованный штамм *T. ferrooxydans,* и способен таким образом повышать эффективность прямого кислотозависимого выщелачивания сульфидов (например, PbS, CdS, NiS) в присутствии элементарной серы.

Умеренные термофилы

Обнаружены различные термофильные, окисляющие пирит, железо и серу бактерии, которые лучше всего растут при температурах около 50°С Эта группа умеренных термофилов включает факультативные гетеротрофы, хемолитотрофные гетеротрофы и автотрофы, причем обнаруживаются все новые и новые организмы этого класса Данные организмы могут играть существенную

роль в выщелачивании саморазогревающихся минералов и угольных отвалов.

Крайние ацидотермофилы

Лучше всего изучен род *Sulfolobus.* Все его виды окисляют серу, а некоторые (например S. *brierleyi*) способны к окислению железа и таких минералов, как халькопирит. Эти организмы переносят температуру до 85 °С и выделены в основном из горячих источников. Впрочем, недавно из дренажных вод угольных отвалов был получен организм, сходный с *Sulfolobus.* Род *Sulfolobus* относится к *Archebacteriaceae* – отдельной группе бактерий, которую предлагают считать третьим царством живых организмов. Представители этого рода, вероятно, играют важную роль в выщелачивании минералов при повышенных температурах.

Все упомянутые выщелачивающие бактерии переводят металлы в раствор различными путями. Соответствующие методы были названы “прямыми” и “непрямыми”. Окислительным процессом, “прямо” катализируемым бактериями, является окисление железа:

$$4FeSO_4 + O_2 + 2H_2SO_4 \rightarrow 2Fe_2(SO_4) + 2H_2O \quad (4.1)$$

и окисление серы:

$$S_8 + 12O_2 + 8H_2O \rightarrow 8H_2SO_4. \quad (4.2)$$

Ряд минералов непосредственна окисляется некоторыми выщелачивающими организмами. Примерами такого рода могут быть окисление пирита:

$$4FeS_2 + 15O_2 + 2H_2O \rightarrow 2Fe_2(SO_4)_3 + 2H_2SO_4 \quad (4.3)$$

и сфалерита:

$$ZnS + 2O_2 \rightarrow ZnSO_4. \quad (4.4)$$

Ион трехвалентного железа служит сильным окисляющим агентом, переводящим в раствор многие минералы, например халькоцит:

$$Cu_2S + 2Fe_2(SO_4) \rightarrow 2CuSO_4 + 4FeSO_4 + S^0 \quad (4.5)$$

и уранинит:

$$UO_2 + Fe_2(SO_4)_3 \rightarrow UO_2SO_4 + 2FeSO_4. \quad (4.6)$$

Выщелачивание, происходящее при участии иона трехвалентного железа,

который образуется в результате жизнедеятельности бактерий, называют "непрямой" экстракцией. Нередко в ходе згой химической реакции образуется элементная сера (реакция (4.5)), которая может непосредственно окисляться бактериями до серной кислоты (реакция (4.2)).

4.3.2. Промышленное применение биоэкстрактивной металлургии

В настоящее время бактериальное выщелачивание, известное также как биогидрометаллургия или биоэкстрактивная металлургия, применяется в промышленных масштабах для перевода в растворимую форму меди и урана.

Выщелачивание медных отвалов. Методы, использовавшиеся в XVIII в. на месторождении Рио-Тинто (Испания) для извлечения меди из груд выветрившейся породы, в основном сохранились до наших дней. В XX столетии выщелачивание отвалов, как называют этот процесс, развивалось в США; оно используется для получения меди из бедных руд (содержащих менее 0,4 % меди по весу), а также из отвального материала с очень низким содержанием меди. Такие отвальные материалы накапливаются при крупномасштабной открытой разработке руды. Бедную руду или отвальную породу перевозят из карьера куда-либо поблизости (обычно в долину), где естественный уклон дает возможность собирать используемые растворы. Во избежание загрязнения подпочвенных и поверхностных вод выбирают непроницаемые для воды участки. Отвалы, образующиеся в результате работы землеройной техники, имеют огромные размеры, достигая в высоту 300 и более метров. Самым большим в мире отвалом является Бингхэм-Каньон ("Кеннекотт Коппер Корпорэйшн"). Он вмещает около $3{,}6 \cdot 10^{12}$ кг породы.

Для начала процесса выщелачивания отвал смачивают водой, подкисленной серной кислотой до pH 1,5 – 3,0, путем ее распыления, полива или инъекции через трубы, помещенные вертикально внутри породы. Этот кислый раствор, или "выщелачиватель", просачивается сквозь бедную руду или отвальные материалы. Он содержит кислород и углекислый газ и создает благоприятную среду для размножения ацидофильных тиобацилл, широко распространенных в сульфидных рудах. В некоторых случаях содержание *Tiobacillius ferrooxydans* превышает 10^6

клеток на 1 кг породы и на 1 мл выщелачивающего раствора. Этот организм активно окисляет растворимые ионы двухвалентного железа и воздействует на серо- и железосодержащие минералы. Активность *T. ferrooxydans* необходима для оптимального выщелачивания. При pH ниже 3,5 окисление железа перестает зависеть от pH:

$$-d(Fe^{+2})/dt = K(Fe^{+2})(O_2),$$

где К=1,0–10^{-7} $атм^{-1}\cdot мин^{-1}$ при 25 °С

Следовательно, при кислых значениях pH, необходимых для выщелачивания отвалов, и в отсутствие *T. ferrooxydans* железо оставалось бы в двухвалентном состоянии и экстракция меди из сульфидных минералов была бы минимальной. *T. ferrooxydans* ускоряет окисление двухвалентного железа в 10 раз. При окислении медно-сульфидных минералов нередко образуется элементарная сера. Эта сера маскирует частицы минералов, ограничивая воздействие на них со стороны трехвалентного железа. *T. ferrooxydans,* присутствующая в количестве 10^3–$I0^5$ клеток на 1 г породы и на 1 мл выщелачивающего раствора, окисляет некоторые растворимые соединения серы и элементарную серу. Разрушение серы этим организмом приводит к удалению маскирующего слоя серы, окружающего некоторые частицы минералов, и усиливает процесс выщелачивания. Таким путем *Thiobacillus thiooxidans, Thiobacillus ferrooxidans* совместно разлагают минералы сульфидной природы и являются мощным окислителем для растворения медно-сульфидных минералов и образования серной кислоты. Эта последняя создает благоприятную среду для деятельности микроорганизмов и удерживает ионы двухвалентной меди в растворе.

Поскольку при выщелачивании отвалов в среде развиваются природные тиобациллы, никакого засева не проводят. Проявлению необходимой активности микроорганизмов способствуют обеспечение кислотности отвала и обилие кислорода. Последнее достигается путем аэрирования выщелачивающего раствора; циркуляции воздуха внутри породы способствует и особая форма отвалов (с гребнями или ребрами). Иногда вертикально внутри отвала помещают

трубы с отверстиями и через них продувают сжатый воздух, способствующий протеканию биологических и химических реакций.

В выщелачиваемых отвалах происходит также много важных небиологических реакций. Самой ценной с экономической точки зрения является окисление медно-сульфидных минералов образующимися биологическим путем ионами трехвалентного железа (например, реакция (4.5)). К другим небиологическим реакциям, протекающим в выщелачиваемых отвалах, относятся гидролиз солей трехвалентного железа с последующим осаждением основного сульфата трехвалентного железа:

$$Fe(SO_4)_3 + 2H_2O \rightarrow 2Fe(OH)(SO_4) + H_2SO_4 \quad (4.7)$$

растворение карбонатных минералов:

$$CaCO_3 + H_2SO_4 + H_2O \rightarrow CaSO_4 + 2H_2O + CO_2. \quad (4.8)$$

и твердофазные превращения, приводящие к образованию вторичных минералов. Все эти реакции стабилизируют pH отвальных пород и выщелачивающего раствора на нужном уровне.

Выщелачиваемые отвалы имеют значительные размеры. Это создает много инженерных проблем и может препятствовать деятельности бактерий и протеканию важных химических реакций. К таким проблемам относятся, во-первых, уплотнение отвалов и образование осадков, которые затрудняют взаимодействие раствора с минералами, во-вторых, попадание внутрь отвалов крупных минерализованных глыб, мало подверженных разрушению, и, в-третьих, повышение температуры отвалов за счет протекания в них экзотермических реакций. Так, в Бингхэм-Каньоне было отмечено повышение температуры выше 80 °С При таких температурах тиобациллы инактивируются, но может повышаться активность термофильных выщелачивающих бактерии. Из отвалов были выделены ацидотермофильные штаммы, близкие к *Thiobacillus,* однако крайне термофильные штаммы *Sulfolobus* не обнаружены. Правда, это не исключает их существования в подобных средах.

Из выщелачиваемых отвалов вытекают растворы, содержащие 0,75 – 2,2 г

меди в 1 л. Эти растворы направляют в отстойники; медь из них получают путем осаждения с использованием железа или экстракцией растворителями. В первом случае создают условия, при которых растворы контактируют с железом, и протекает следующая реакция:

$$CuSO_4 + Fe^0 \rightarrow Cu^0 + FeSO_4 \qquad (4.9)$$

“Отработанные” выщелачивающие растворы вновь поступают в отвал. В последние годы для получения меди из раствора начали применять экстракцию растворителями. Ионы меди из водной фазы экстрагируют органическими жидкостями, только частично растворимыми в воде. Затем медь извлекают из органического растворителя.

Выщелачивание урана. Для экстракции урана бактерии применяются реже. Для того чтобы при выщелачивании урана можно было использовать микробиологическую технологию, руда и (или) связанные с ней породы должны быть богаты сульфидными минералами и не слишком интенсивно поглощать кислоту. Бактериальное выщелачивание урана применяли в восточных районах Канады для извлечения остаточного урана на уже выработанных площадях, а также из отвалов. В первом случае стенки и крыши забоев (при подземной выработке) промывали обычной или подкисленной водой. Для роста бактерий достаточно 3–4 месяцев, за это время *T. ferrooxydans* окисляет железо до трехвалентного состояния. Затем трехвалентное железо окисляет восстановленный уран до растворимого окисленного состояния в соответствии с реакцией (4.6). По прошествии этого периода забои снова промывают. Промывные воды, содержащие уран, собирают и извлекают из них уран с помощью ионного обмена, либо экстрагируют растворителями.

Бактериальное выщелачивание применялось в Канаде и в качестве первичного средства для получения урана. Рудное тело разрушали взрывом и осуществляли выщелачивание *in situ*. Как и при выщелачивании меди в отвалах, при выщелачивании *in situ* часто приходится осуществлять инженерные мероприятия, что отрицательно сказывается на активности бактерий.

Чановое выщелачивание используется в горнорудной промышленности для извлечения урана, золота, серебра и меди из окисных руд. Медные и урановые руды сильно измельчают и смешивают с растворами серной кислоты в больших емкостях (обычно размером 30·50·6 м) для перевода металла в растворимую форму. Время выщелачивания, как правило, составляет несколько часов. Медь получают из кислого раствора электролизом, уран – ионообменным путем или экстракцией растворителем. Ферментация в чанах, а также в отстойниках с постоянным или предварительным перемешиванием может с успехом применяться для бактериального выщелачивания, потому что при этом легко контролировать факторы, влияющие на активность микроорганизмов. К этим факторам относятся: размер частиц руды, ее качество, плотность пульпы (масса руды на единицу объема раствора), pH, содержание углекислого газа, кислорода, время удержания (время нахождения частиц в реакторе), температура и содержание питательных веществ. Хотя руда и не стерилизуется, возможен строгий контроль за видовым составом и количеством микроорганизмов. Чановое выщелачивание создает предпосылки для использования специфических штаммов микроорганизмов (например, ацидотермофильных бактерий) или микробов-вышелачивателей, полученных методами генетической инженерии. Вначале чановое выщелачивание применяли для руд с очень высоким содержанием металлов, однако эта технология может использоваться и в случае материалов более низкого качества. При этом следует учитывать экономические и технологические факторы.

Кучное выщелачивание применяют для химической экстракции урана, меда, золота и серебра. При выщелачивании урана и меди руду измельчают и помещают на специальные водонепроницаемые поверхности. При извлечении меди и урана кучи могут содержать $(10 - 50) \cdot 10^8$ кг руды и в высоту достигать 4,5 – 5,5 м. Вершины куч выравнивают и наносят на них раствор серной кислоты. Новые кучи часто помещают поверх уже существующих. Такой способ выщелачивания урана и меди сходен с выщелачиванием отвалов; однако здесь используются

более концентрированные растворы серной кислоты, частицы породы меньше по размеру, а качество породы (содержание металла в ней) выше. Кучное выщелачивание длится несколько месяцев, а для выщелачивания отвалов требуются годы. Этот метод применим также для экстракции золота и серебра из руд и даже из отходов, подобных шламу (пустая порода, остающаяся после извлечения руды и размельчения). Чтобы обеспечить эффективное протекание выщелачивающего раствора, тонко измельченный шлам должен быть подвергнут агломерации (спекание в шарики). В щелочных растворах цианидов серебро и золото образуют комплексы, которые затем отделяют от раствора с помощью активированного угля. Кучное выщелачивание требует относительно небольших капиталовложений и технического обеспечения и представляет собой легко реализуемую систему. Благодаря небольшим масштабам операций при таком выщелачивании величину частиц породы, размеры куч, контакт между раствором и частицами, аэрацию, pH, состав растворов можно строго контролировать; с таким выщелачиванием хорошо сопрягаются процессы биоэкстракции. Их использование расширяет возможности методов кучного выщелачивания, позволяя осуществлять извлечение других металлов или проводить предварительную биологическую обработку материала до начала обычных процессов экстракции.

4.3.3. Экологическая значимость

Хотя процессы биологического выщелачивания и представляют собой альтернативу обычным процессам экстракции, маловероятно, что микробиологическая технология в ближайшем будущем заменит такой издавна существующий процесс, как выплавка металлов. Тем не менее, подобно другим гидрометаллургическим процессам типа кислотного кучного выщелачивания урановых и медных окисных руд и выщелачивания золотоносных и серебряных руд с помощью цианидов, эффективные методы бактериального выщелачивания, несомненно, могут оказать заметное влияние на технологию переработки минерального сырья.

Предполагается, что микробиологическая технология позволит

перерабатывать руды и отходы, использование которых обычными методами неэкономично. Примерами такого рода являются переработка огромных количеств, шламов и отходов с небольшим, но все же заметным содержанием драгоценных или стратегических металлов, а также экстракция металлов, заключенных в минеральных матриксах. Бактерии легко разлагают пирит, арсенопирит и другие минералы с освобождением металлов.

Еще одна область применения биологического выщелачивания, которая обещает быть экономически выгодной, – избирательное выщелачивание некоторых металлов; при этом один из металлов какого-либо минерала переходит в раствор, а остальные остаются нерастворенными. Некоторые минералы для увеличения их способности к флотации можно подвергнуть предварительному биологическому выщелачиванию. Флотация представляет собой метод разделения минералов, состоящий в том, что образуемая реагентами пена поднимает на поверхность воды некоторые тонко измельченные минералы, тогда как другие тонут.

Последствия для окружающей среды, к которым ведет использование многих обычных методов добычи руд, их обогащение, а также выплавка металлов, весьма существенны. Общепринятые способы добычи и обогащения руд часто ведут к нарушению поверхностных слоев Земли из-за создания гигантских открытых карьеров и гор пустой породы и шламов. Это может создавать экологические проблемы. При выплавке металлов из сульфидных руд и сжигании углей с высоким содержанием серы образуются зола и двуокись серы, представляющие потенциальную опасность для окружающей среды. Биогидрометаллургия в сочетании с технологией выщелачивания *in situ* способна уменьшить разрушение земной поверхности, вызываемое разработкой и обогащением руд общепринятыми методами, а также устранить необходимость в выплавке металлов из сульфидных минералов. С помощью этого подхода можно будет извлекать сульфидные минералы при небольшом их содержании и большой глубине залегания. Разработка подобных месторождении общепринятыми подземными методами или открытым способом нерентабельна.

Одна из самых многообещающих возможностей бактериального выщелачивания – использование его для удаления серы из угля перед сжиганием последнего. Выщелачивающие бактерии легко катализируют растворение неорганической (пиритной) серы, содержащейся в каменном угле; однако на органическую серу эти бактерии не действуют. Были исследованы и другие бактерии, способные эффективно удалять серосодержащие органические вещества из каменного угля.

Прежде чем проводить точный экономический анализ технологии бактериального выщелачивания, необходимо тщательно изучить все ее достоинства и недостатки, сравнив их с таковыми для существующих пирометаллургических и гидрометаллургических процессов. По сравнению с обычными методами добычи и обогащения руд и выплавки металлов бактериальное выщелачивание может оказаться вполне конкурентоспособным благодаря меньшим энергозатратам, снижению расхода реагентов при экстракции металлов, а также меньшему влиянию на окружающую среду.

РАЗДЕЛ 5. ОХРАНА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

5.1. Биоповреждение материалов

Термин “биоповреждение” вошел в наш язык лишь в последнее время, но обозначаемые им процессы известны человеку издавна, с тех пор, как он начал перерабатывать природное сырье и заботиться о сохранности пищевых продуктов. Организмы, ответственные за процессы биоповреждения, сопровождали нас и в еще более отдаленном прошлом, будучи существенным звеном в круговороте элементов биосферы. Человек рано осознал необходимость защиты сырья и пищевых продуктов от возвращения их в этот круговорот и стал использовать для замедления жизнедеятельности микроорганизмов консервирование или другие защитные способы. Консервирование как эмпирический процесс существует несколько тысячелетий, и имеется множество описаний его использования.

Однако для более полного понимания принципов этого процесса и его

научного осмысления потребовалось появление микроскопа и возможностей селективного культивирования и идентификации организмов, вызывающих биоповреждения.

Начало исследованиям процессов биоповреждения положила вторая мировая война; это было связано с поступлением чувствительных к биологическим воздействиям материалов на театры военных действий, где высокая температура и влажность ускоряли их порчу. С тех пор мы все более глубоко осознаем те проблемы, которые связаны с биоповреждениями продуктов, изготовленных из природного, а позднее – из синтетического сырья. Для полного понимания природы этих процессов требуются совместные усилия экологов, физиологов, биохимиков и ученых других небиологических направлений, таких как технология и материаловедение.

Под биоповреждением понимают “любое нежелательное изменение свойств какого-либо материала, вызванное жизнедеятельностью различных организмов”. В широком смысле это процесс, приводящий к уменьшению ценности любого материала. При этом имеются в виду те свойства данного материала, которые обуславливают его использование в определенных целях. По своей природе эти изменения могут быть механическими, физическими или касаться эстетических свойств материала и не обязательно приводят к его химическому разрушению. Последний момент важен для определения различий между биоповреждением и биоразложением (биодеградацией). “Биоповреждение” – термин более широкий, “биоразложение” – ограниченный, относящийся только к разрушению каколибо продукта (часто сырья), попавшего в окружающую среду (например, нефтепродуктов, пестицидов или детергентов), В общем смысле биоповреждение – процесс нежелательный, а биоразложение обычно рассматривается как желательный.

Употребление слова “организм” предусматривает участие в этом процессе представителей животного и растительного мира; так оно и есть на самом деле. Микроорганизмы как факторы биоповреждения широко изучались и хорошо представлены в литературе. Однако нельзя недооценивать роль насекомых,

грызунов, зеленых растений (в том числе водорослей) и даже птиц.

5.2. Классификация процессов биоповреждения

Использование термина “материалы” в определении биоповреждений означает, что речь идет о “неживом”, в отличие от патологии, изучающей различные нежелательные процессы в живой материи. Различия эти зачастую очень тонки, иногда наблюдается перекрывание в том смысле, что организмы, обнаруживаемые в живой материи или органических остатках, сохраняют свою жизнедеятельность и в неживой материи, уменьшая ценность данного продукта в процессе хранения. Однако во многих случаях со смертью организма хозяина изменяются условия питания и клеточные компоненты, что приводит к изменению и типа организма, “колонизирующего” данный материал. Так, говоря о действии грибов на хлебные злаки, мы разграничиваем “полевые грибы” и “грибы хранилищ”.

Условно можно выделить три типа биоповреждений (табл.2), которые часто в значительной мере перекрываются.

Об их наличии очень полезно знать при выборе направления исследований или при разработке рекомендаций, касающихся условий хранения продуктов и материалов и создания новых биодобавок.

Таблица 5.1 – Классификация типов биоповреждений

Процесс	Примеры
1. Механический	Повреждение “несъедобных” материалов (например, свинцовых труб, пластмассовых покрытий) грызунами и насекомыми (погрызы, сквозные отверстия). Повреждения дорожных покрытий и стен, вызванные ростом растений
2. Химический а) ассимиляционный	Использование в качестве источника питательных веществ субстратов, содержащихся в тех или иных материалах (например, целлюлозы древесины или кератина шерсти)
б) диссимиляционный	Продуцирование организмом какого-либо продукта (например, кислоты или токсичного вещества), вызывающего коррозию материала или другие повреждения, в результате которых материал становится непригодным для использования
3. Засорение и	Засорение трубопроводов; обрастание ракушками и

загрязнение	водорослями корпуса судов; коррозия и потускнение декоративных покрытий и пластиковых занавесей в результате роста грибов не на самом материале, а на поверхностных загрязнениях

5.3. Материалы, подверженные биоповреждениям

При описании биоповреждений легче всего проводить их классификацию по типу продукта. Однако это оказывается затруднительным, если мы имеем дело со сложными продуктами, например с красками, где встречаются комбинации исходного сырья, такого, как целлюлоза и синтетический полимер; здесь классификация по типу продукта невозможна. Среда, в которой хранится и используется данный продукт, часто оказывает заметное влияние на организмы, которые в нем обитают, и на активность этих организмов. Характерные признаки биоповреждения различных материалов приведены в табл. 3. В следующих разделах мы вкратце рассмотрим продукты, подвергающиеся биоповреждениям.

Таблица 5.2 – Характерные признаки биоповреждения различных материалов

Материал	Характерные признаки биоповреждений	Микроорганизмы
Металл, сплав металлопок-рытие	Шероховатые, малозаметные углубления, иногда под шламом и тонким налетом продуктов коррозии; язвенные углубления кратерообразной формы, иногда сквозные с обильным налетом продуктов коррозии; черная сухая корка или пастообразное вещество с белыми или серыми включениями	Бактерии, грибы, продукты их жизнедеятельности
Полимер	Потускнение поверхности, потеря глянца, иногда обесцвечивание или появление цветных пятен; тонкие, едва заметные визуально налеты увлажненных участков; визуально заметные налеты мицелия (порошкообразные, сетчато переплетенные, клочковатые скопления) на отдельных участках поверхности; изменение диэлектрических свойств электроизоляционных материалов; снижение механической прочности; потеря герметичности прокладочных материалов; набухание и изменение формы деталей; затвердевание, охрупчивание,	Бактерии, актиномицеты, грибы

	растрескивание и выкрашивание материалов	
Лакокрасочное покрытие (ЛКП)	Пятна на поверхности, образование бугристости; визуально заметный налет, развитие микроорганизмов внутри пленки и под ней; изменение физико-механических свойств покрытия (потеря эластичности, прочности, вздутия, отслаивания, растрескивание); образование и накопление продуктов коррозии под пленкой.	То же
Эластомеры, каучук, резина	Потускнение поверхности, слизистые пятна, пигментация, специфический запах; сетка мелких трещин с поверхностным налетом темного цвета; налет (порошкообразного и войлочного) мицелия грибов, визуально заметного; снижение герметизирующих свойств уплотнительных материалов; снижение диэлектрических свойств электроизоляционных материалов; набухание и изменение формы деталей	Бактерии, грибы, актиномицеты
Строительный материал (древесина, камень, бетон, кирпич, связующие)	Появление цветных пятен; визуально заметный налет (порошкообразный и войлочный); снижение механической прочности материалов; размягчение и раскрашивание материалов	Бактерии, грибы, актиномицеты и другие обрастатели
Топливо, масло, горючесмазочный материал (ГСМ), специальная жидкость, технологическая добавка органической природы	Рыхлые налеты, отличающиеся по цвету и консистенции в поверхностных слоях смазочного материала, в объеме топлива или на границе раздела водного и топливного слоев; расслоение жидких продуктов, помутнение, выпадение осадков; образование стойких эмульсий, снижение эксплуатационных свойств продуктов; налеты коррозии на поверхностях элементов металлоконструкций, контактирующих с ГСМ	Бактерии различных видов, реже грибы и актиномицеты

5.3.1. Металлы и камни

Биокоррозией является процесс коррозионного разрушения металла в условиях воздействия микроорганизмов. Часто инициирование процессов электрохимической коррозии металлов связано с жизнедеятельностью бактерий и грибов. Биокоррозия может рассматриваться как самостоятельный вид коррозии наряду с такими, как морская, атмосферная, грунтовая, контактная и т. п. Однако чаще она протекает совместно с атмосферной или почвенной, в водных растворах или в неэлектролитах, инициирует и интенсифицирует их. Идентифицирование биокоррозии, особенно на ранних стадиях её развития, возможно при проведении целенаправленных биохимических исследований.

Биокоррозия является характерным процессом разрушения металла оборудования в ряде отраслей промышленности. Биоповреждениям подвержены подземные сооружения, метро, оборудование нефтяной промышленности, топливные системы самолетов, трубопровод при контакте с почвой и водными средами, элементы конструкций машин, защищенные консервационными смазочными материалами и лакокрасочными покрытиями.

Бактериальная коррозия может происходить при 6...40 °С, $pH = 1...10{,}5$ в присутствии органических и неорганических веществ, включающих элементы: углерод, серу, азот, фосфор, калий, железо, водород, кислород и др.

Разрушение металла происходит по следующим причинам, непосредственно или косвенно связанным с жизнедеятельностью бактерий: на поверхности металла образуются различные электрохимические концентрационные элементы; в растворе или на поверхности металла создаются агрессивные химические соединения; изменяются электрохимические потенциалы среды в связи с изменением концентрации кислорода в растворе.

Бактерии быстро размножаются и легко приспосабливаются к изменяющимся физическим, химическим и биологическим условиям среды. Последнее объясняется тем, что они могут адаптивно образовывать ферменты, необходимые для трансформации питательных сред.

В природе аэробные и анаэробные бактерии существуют совместно. В почве

наиболее интенсивная коррозия наблюдается болотистых местах ($pH = 6,8...7,8$), насыщенных органическими остатками с пониженным содержанием кислорода. Поверхность конструкций, имеющих значительную протяженность (трубопровод), становится анодной по отношению к участкам, контактирующим с более аэрированной почвой, и коррозия ускоряется. В анодных зонах возможно окисление гидрозакиси железа железобактериями.

Бактерии могут инициировать коррозию меди, свинца и других металлов с образованием сульфидов.

Микологическая (грибная) коррозия – разрушение металлов и металлических покрытий при воздействии агрессивных сред формирующихся в результате жизнедеятельности мицелиальных (несовершенных, плесневых) грибов. Она является частным случаем биоразрушения материалов конструкций в специфических условиях эксплуатации.

Биоповреждения материалов эксплуатирующихся машин и сооружений грибами представляет большую опасность. Они могут снижать прочностные, электроизоляционные и другие свойства материалов и покрытий, стимулировать коррозию металлов. Видовое многообразие грибов, их высокая приспособляемость к условиям обитания приводят к тому, что объем повреждаемости ими материалов значительно превышает объем, стимулируемый бактериями. К тому же, методы защиты конструкций техники от биоповреждений грибами разработаны недостаточно. Если для развития сульфатвосстанавливающих, метанообразующих и железобактерий необходимы специальные условия, то для микрогрибов достаточно незначительного загрязнения и временного повышения влажности воздуха, чтобы образовалась колония на поверхности конструкции.

Повреждения грибами имеют характерные признаки и особенности грибы не содержат хлорофилла и по способу питания относятся к гетеротрофам, т.е., как и гетеротрофные бактерии, потребляют углерод из готовых органических соединений, в том числе из ядов (цианидов, фенола и др.). Размножение грибов происходит разрастанием гиф и спор.

Воздушные среды, содержащие углекислоту, аммиак, этиловый спирт и другие вещества, могут стимулировать развитие отдельных видов грибов. Основным фактором, способствующим развитию грибов, является вода, которая составляет главную часть клеточного тела гриба. Пылевидные частицы, оседающие на поверхности изделия, обычно содержат споры грибов и органические соединения, необходимые для питания грибницы. Эти частицы, являясь гигроскопичными, сохраняют влагу на поверхности материала. Большое влияние на прорастание спор оказывает температура. Температурный интервал жизнедеятельности грибов достаточно широк (0...+45 °С), при этом каждый вид грибов имеет свой температурный оптимум. Некоторые грибы способны развиваться и при более высоких (термофилы) или более низких (психрофилы) температурах. Отрицательное влияние на рост грибов оказывает движение воздуха, которое препятствует оседанию спор на поверхности материала и повреждает мицелий. Значительное увеличение или уменьшения pH также неблагоприятны для развития грибов.

Микрогрибы распространены повсеместно и легко адаптируются к различным условиям среды. Особую опасность представляют грибы-продуценты кислот. Они могут стимулировать процессы коррозии.

Камни подвержены воздействиям многочисленных химических и иных факторов окружающей среды, способствующих их эрозии. Проблема биоповреждений камня возникает в связи с применением его в строительстве или для изготовления памятников, когда необходимо сохранить данную конструкцию. Как и в случае металлов, продемонстрировать непосредственное участие микроорганизмов в подобных процессах разрушения крайне трудно. Тем не менее было предложено несколько механизмов. Первый из них – механическое воздействие: развитие микроорганизмов способствует накоплению воды, замерзание и оттаивание которой приводит к разрушению поверхностей. Второй механизм состоит в расширении и сжатии микробных клеток, а третий – в образовании хелатных комплексов между минералами и органическими кислотами, выделяемыми микробами. Бактерии могут переводить в раствор

нерастворимые фосфаты и силикаты за счет образования 2-кетоглутаровой кислоты. Видимо, в разрушении камней существенную роль играют не упоминавшиеся до сих пор лишайники, что может быть обусловлено их способностью к сжатию и расширению (изменение влажности от 15 до 300 % за 2–3 ч) при высушивании или увлажнении и к проникновению внутрь пород. Недавно были изучены спилы пород, населенных лишайниками; показано, что гриб-симбионт способен глубоко в них проникать и избирательно растворять минеральные компоненты.

5.3.2. Резины и пластмассы

Резины и пластмассы представляют собой материалы, содержащие каучук или какой-либо синтетический полимер. До 50 %-их состава может приходиться на долю добавок, используемых в качестве пластификаторов, антиоксидантов и веществ, защищающих данный материал от гидролиза и УФ-света. Кроме того, добавки служат наполнителями и пигментами. Многие из них чувствительнее к повреждениям, чем сам полимерный “скелет”. Так, поливинилхлорид (ПВХ) в непластифицированной форме очень устойчив к биоповреждениям, однако применение его как такового ограничивается тем, что он не пластичен. Для придания такому материалу пластичности в него вводят пластификатор, которым часто служит сложный эфир органической кислоты, однако этот же пластификатор повышает чувствительность материала к биоповреждениям.

Природные каучуки состоят из регулярно повторяющихся изопреновых остатков, подверженных окислению, в результате которого возрастает вероятность разрушения их под действием микроорганизмов. Введение поперечных сшивок и добавление антиоксидантов замедляют этот процесс. Были созданы синтетические каучуки с улучшенными свойствами, в том числе устойчивые к биоповреждениям. Очень устойчивы к действию микробов силиконовые, нитрильные и неопреновые резины.

В целом синтетические полимеры, используемые в качестве пластмасс (такие как полиэтилен, полистирол и ПВХ), сами по себе устойчивы к микроорганизмам. Однако некоторые из полимеров, применяемых все более широко, оказались

чувствительными к ним. Таковы полиуретаны – нечетко ограниченное семейство полимеров, выделяемое по признаку наличия уретановой группировки; молекула их содержит также замещенные мочевинные, биуретовые, амидные и аллофанатные группировки. Кроме того, для придания такому полимеру эластичности в него химическим путем вводят простые и сложные эфирные группировки. Большая часть всех этих группировок в соответствующих условиях чувствительна к химическому, а также, вероятно, к ферментативному гидролизу. Видимо, подверженность гидролизу определяется конфигурацией молекулы; известно также, что сложноэфирные связи особенно легко гидролизуются микроорганизмами. По крайней мере, в одном случае было показано, что вероятность биоповреждения уменьшается в результате использования соединений, препятствующих гидролизу. Тем не менее наши знания относительно путей расщепления полиуретанов остаются далеко не полными. Высокая износоустойчивость полиуретанов и их стойкость к истиранию гарантировали им прочное место на рынке пластмасс, и маловероятно, что в ближайшем будущем им будет найдена замена.

5.3.3. Поверхностные покрытия

Поверхностные покрытия (краски, различные типы лаков) играют двоякую роль: они выполняют декоративную функцию и защищают покрываемую поверхность опт вредных воздействий среды, в том числе и от микроорганизмов. Из-за постепенного отказа от введения свинца в состав красок и широкого распространения эмульсионных покрытий возникла проблема биоповреждения самих красок. Такое повреждение происходит как при хранении красок в емкостях, так и после нанесения их на поверхность и высыхания с образованием пленки. Большинство исследований в этой области направлено на создание эффективных защитных систем, которые действовали бы все то время, пока существует данное покрытие. Краски содержат пигменты, связывающие вещества, эмульгаторы, масла, смолы и смачивающие агенты; они могут быть растворены в воде или в специальных растворителях. Некоторые из этих ингредиентов, например казеин, крахмал, целлюлоза и пластификаторы, могут

разрушаться микробами, а применение альтернативных, устойчивых к микробному разрушению компонентов зачастую невозможно. Развитие микроорганизмов в пленках очень сильно зависит от факторов окружающей среды: температуры, влажности, наличия на поверхности питательных веществ (например, удобрений, приносимых ветром). Повреждения в емкостях часто связаны с жизнедеятельностью бактерий, но могут быть обусловлены и развитием грибов. Кроме того, в жидких эмульсионных красках могут оставаться внеклеточные ферменты, например, входящие в состав целлюлазной системы; эти ферменты способны снижать вязкость эмульсии.

5.3.4. Пищевые продукты

В тех странах, где наиболее остро стоит продовольственная проблема, особенно велики и потери сырья после уборки урожая. В развитых странах продукты различными способами защищают от грибов, насекомых и грызунов, так что потери сводятся к минимуму. При хранении зерна необходимо использовать различные химические и физические способы защиты, например пестициды и высушивание. Много неприятностей причиняет присутствие микотоксинов в продуктах, которые были заражены грибами, часто на ранних стадиях хранения. Это может приводить к браковке крупных партий зерна, тем более, если оно используется в качестве корма Особенно тщательной должна быть защита опт заражения готовых продуктов. Упаковка может приводить как к подавлению роста микроорганизмов, так и к его стимулированию. Использование немногочисленных химических консервантов регулируется в соответствии с их химической природой законодательным путем.

5.3.5. Целлюлоза

Целлюлоза в своей исходной форме, в виде различных волокон и древесины, столетиями сложила сырьем для получения многих материалов и продуктов. Специалисты по защите материалов постоянно занимались вопросами сохранности изделий из материалов на основе целлюлозы, и сегодня результаты этих исследований широко используются в деревообрабатывающей и текстильной промышленности. Организмы, расщепляющие целлюлозу, составляют лишь

небольшой процент от общего числа известных видов грибов и бактерий; несмотря на это, разрушение материалов на основе целлюлозы представляет собой весьма распространенное явление и в соответствующих условиях может происходить очень быстро. В земле при 25 °С хлопчатобумажная ткань полностью теряет свою прочность за 10 сут. Известно что, за разрушение целлюлозы ответственны скорее всего грибы. Условия внутри целлюлозных материалов (относительная влажность меньше 90 %, очень низкое содержание азота, кислый pH) часто оказываются благоприятными для их развития. Разветвленные гифы грибов с легкостью проникают сквозь клеточные стенки, ближе к целлюлозе, обычно тесно связанной с лигниновой и гемицеллюлозной матрицей. Определенную роль, несомненно, играют и бактерии: они наверняка участвуют в разрушении пектиновых слоев и углублений в древесине мягких пород, что приводит к проникновению внутрь древесины воды и бактерий.

Подверженность древесины биоповреждениям обусловлена характером распределения в ней питательных веществ. Если древесина соответствующим образом не просушена, а заболонь не срезана для предотвращения миграции питательных веществ, то во влажных условиях может развиться ее голубое окрашивание и начаться поверхностное повреждение.

Для повышения качества или улучшения тех или иных свойств древесины ее можно химически модифицировать. Повышенной устойчивостью к микроорганизмам (видимо, из-за уменьшения гидролизуемости) обладают ацетат целлюлозы, вискоза и различные замещенные производные целлюлозы (например, карбокси- и этоксицеллюлоза). При введении в эмульсии замещенные производные целлюлозы действуют как наполнители и агенты, влияющие на вязкость.

5.3.6. Продукты животного происхождения

Большинство продуктов животного происхождения, чувствительных к биоповреждениям, имеет белковую природу. К ним относятся шкуры, шерсть и клеи. Бактерии и грибы часто оказывают неблагоприятное воздействие на шкуры и шерсть уже на ранних этапах их обработки. Из-за большой загрязненности

свежих шкур или шерсти их порча может начаться в течение 48 ч еще на бойне или в помещении для стрижки. Для предотвращения этого процесса шкуры дубят, а шерсть обезжиривают. Однако при некоторых способах дубления шкуры вымачивают вначале в воде. Если такое вымачивание проводится при повышенных температурах и продолжается длительное время, происходит размножение бактерий. В коже, используемой для изготовления книжных переплетов, нередко бывает повышено содержание углеводов, что способствует развитию плесени при хранении в условиях повышенной влажности. В целом шерсть наиболее чувствительна к бактериям во время обработки, а клеи могут разрушаться как при хранении в различных емкостях, так и после высыхания и образования пленки.

5.3.7. Топлива и смазочные материалы

Микроорганизмы, потребляя непосредственно углеводород и воздействуя продуктами метаболизма, изменяют состав масел, топлив, смазочных материалов, ухудшая их физико-химические и эксплуатационные свойства. Скорость размножения микроорганизмов может достигать колоссальных значений, при этом происходит быстрое нарастание микробной массы, и нефтепродукты становятся непригодны. Особую опасность вызывает это явление при эксплуатации летательных аппаратов. Забивка фильтров и топливных систем микробной массой и продуктами обмена может привести к авариям двигателей и катастрофам при полете.

Из существующих в природе более 150 тыс. видов микроорганизмов около 200 способны окислять углеводороды. Не существует углеводородов, устойчивых к воздействию микроорганизмов.

Нефтяные топлива подвержены биоповреждениям при хранении, транспортировании и эксплуатации. Особенно нестойки к биоповреждениям топлива, предназначенные для летательных аппаратов. Стимулируют биоповреждения топлив повышенная температура (более 20 °С), загрязнения, попадающие в емкости, накопление воды. Более благоприятные условия для развития микроорганизмов создаются в зоне раздела топливо–вода. Это

наблюдается в хранилищах топлив: происходит порча топлив, коррозия емкостей. Оптимальное значение pH среды для развития микробов в топливах 7...7,5, при pH>9 процесс биоповреждений топлив практически прекращается. Наибольший рост бактерий и грибов-окислителей углеводородов наблюдается в интервале температур 25...40°С. Однако существуют психрофильные и термофильные микроорганизмы, разрушающие топлива.

Микроорганизмы обладают избирательной способностью к окислению субстрата, их ферментативные системы адаптируются к определенным группам углеводородов. Так, некоторые из них интенсивно разрушают твердые н-парафины, медленнее – газообразные и жидкие. Изоалканы разрушаются еще медленнее. Наименее уязвимы соединения ароматического ряда.

Некоторые исследователи отмечают, что одним из основных разрушителей топлив в баках реактивных самолетов является гриб Cladosporium resinae. Он преимущественно растет на жидких углеводородах, а продукты его метаболизма являются причиной деструкции топлив. В научно-популярной литературе его называют керосиновым грибом. Этот гриб может развиваться в топливных резервуарах при ограниченном доступе воздуха на границе топливо–вода, при значительной толщине топливного слоя. Мицелий распространяется в углеводородах, а не в воде. Гриб сохраняет жизнестойкость в обезвоженных топливах и растет при здании влаги или в парах углеводородов. Достаточно 1...7 сут., чтобы образовалась микробная масса, влияющая на работоспособность фильтров, форсунок, клапанов и других элементов конструкций топливных систем. В авиационных топливах обнаружены также гриб Aspergillus nigcr, бактерии Pseudomonas aeruginosa, Desulfovibrio desulfuricans и др.

Смазочно-охлаждающие жидкости (СОЖ), применяемые при обработке металлов резанием и представляющие собой водные эмульсии и органические жидкости, являются благоприятной средой для развития микроорганизмов. При этом водно-масляные эмульсии повреждаются преимущественно бактериями (например, типа Desulfovibrio), восстанавливающими сульфаты до сероводорода, а синтетические жидкости – микрогрибами (например, Aspcrgillus, Penicillium,

Cladosporium, Trichoderma) и дрожжами. Развитие микроорганизмов происходит в основном при хранении СОЖ или при остановках циркуляционных систем. Интенсифицируют жизнедеятельность микроорганизмов отсутствие аэрации света, повышение температуры, попадание загрязнений – пыли, металлических частиц. Развитие микроорганизмов в СОЖ снижает их технологические свойства и может привести к коррозии станочного оборудования предприятий промышленности.

Масла и смазочные материалы, как и топлива, являются нефтепродуктами и подвергаются воздействию микроорганизмов. Наибольший вред наносят им микрогрибы и бактерии.

5.3.8. Морское обрастание

Под морским обрастанием понимают поселение растительных и животных организмов на подводных поверхностях кораблей, портовых сооружений, трубопроводах и т. п. В результате обрастания повреждаются защитные покрытия конструкций, усиливаются процессы электрохимической коррозии. Кроме этого, снижаются скоростные характеристики и растут энергозатраты для поддержания требуемых ходовых качеств судов. Большой материальный ущерб наносят обрастатели системам водоснабжения, гидроаппаратам охлаждающим установкам, гидротехническим сооружениям.

Процесс обрастания начинается с оседания личинок обрастателей на подводные поверхности. Для судов наиболее опасен бентос (животные и растения, обитающие преимущественно на морском дне, скалах и камнях). До оседания личинки обрастателей свободно перемещаются в воде и являются составной частью зоо- или фитопланктона. После определенных метаморфоз они прочно оседают на поверхности. Жизнеспособность обрастателей велика они составляют до 40...90 % взвешенных частиц планктона. В процессе обрастания участвуют многие классы микробов, водорослей и беспозвоночных животных: их более 3 тыс. видов. Массовыми являются 50...100 видов, не считая микроскопические бактерии грибы, синезеленые, диатомовые водоросли.

Условно обрастатели можно разделить на две группы: микро- и макроорганизмы.

К микроорганизмам относят обрастатели, тела которых мене 1 мм. Это

бактерии, использующие различные органические вещества и отбросы – детрит, микрогрибы, микроводоросли (синезеленые, диатомеи, простейшие животные). Они создают на поверхности конструкций первичную слизистую пленку, экранируя или выщелачивая яды из необрастающих красок и таким образом стимулируют процесс обрастания более крупными организмами. Размножение микрообрастателей происходит очень быстро, особенно фитопланктона. Одна одноклеточная диатомовая водоросль, размножаясь путем деления, может за 4 сут дать 140 млрд. особей. В действительности биомасса популяции морских обрастателей с временем уменьшается из-за недостатка питания, кислорода, накопления метаболитов, конкуренции с другими микроорганизмами.

Стимулированию коррозионных процессов в большей степей способствуют микрообрастатели, которые могу существовать в анаэробных условиях под макрообрастателями например домиками балянуса. Неравномерное распределение обрастателей на металлических поверхностях приводит к возникновению макроэлектропар и усилению неравномерной коррозии.

К макроорганизмам относят многоклеточные организмы, видимые невооруженным глазом. Это растения (зеленые водоросли) или животные (губки, мшанки, моллюски и др.).

Из зеленых водорослей наиболее массовые нитчатые – неветвящиеся улотрикс и ветвящийся кладофора. Многочисленные виды энтероморфы (морские, солоноватоводные, пресноводные и эврибионтные) могут развиваться при высоких концентрациях органических загрязнений воды, в том числе токсичными веществами. Из красных водорослей в обрастаниях участвуют полисифония, церамиум, каллитамний и камневидный литотамний.

Животные-макрообрастатели наносят наибольший ущерб, так как многие из них имеют твердый скелет и прикрепляются к поверхностям конструкций весьма прочно, разрушая покрытия механическим путем.

В реальных условиях эксплуатации кораблей и сооружений обрастання представляют биоценоз многих организмов – они многослойны. В результате борьбы за существование нижние слои погибают, обеспечивая условия жизни для верхних слоев. В нижнем слое обычно расположены микроорганизмы, затем

балянусы, гидроиды, на них мшанки, а сверху – мидии. Обрастанию подвержены многие материалы конструкций: полимеры, ЛКП, стекло, металлы.

5.4. Биологический контроль водных систем

Одной из сложных аналитических задач является анализ водных сред на содержание токсичных ионов металлов. Металлы в растворах могут существовать в различных формах: катионы, комплексы. Эти соединения имеют различную биологическую активность. Совершенно очевидно, что для правильной оценки токсического воздействия растворенных веществ в воде необходимы методы контроля, позволяющие определять общее содержание физиологически активных соединений и отдельных веществ, что невозможно сделать, применяя только физико-химические методы контроля.

Одними из наиболее достоверных и информативных методов контроля загрязнения окружающей среды являются биологические методы анализа. Аналитическим индикатором в этих методах является биологический объект (тест-объект), а ответной реакцией (тест-реакцией) – интегральная оценка биологически активных форм анализируемых веществ.

Биологические индикаторы реагируют на малейшие изменения состава окружающей среды и дают быструю информацию о биологической активности как отдельных компонентов, так и их совокупности. Особый интерес представляют методы, где биологические индикаторы позволяют определить низкие концентрации анализируемых веществ. Аналитическими индикаторами могут быть различные живые микроорганизмы, их органы и ткани, физиологические функции, биохимические реакции и др.

Сущность биологических методов анализа заключается в том, что живые существа для своего роста и размножения требуют среду строго определенного химического состава. Малейшие изменения качества окружающей среды вызывают соответствующую реакцию организма (биологический сигнал). Это и является основой метода определения соединения или иона.

Ответный сигнал индикаторного организма на изменение химического состава твердой, воздушной или жидкой сред может быть самым разнообразным:

изменение характера поведения, интенсивности роста, состава крови, нарушение функций дыхания, размножения и др. (табл.5.3).

Таблица 5.3 – Ответные реакции организмов, используемых для оценки содержания загрязняющих веществ

Ответная реакция	Организмы	Способ регистрация	Определяемые вещества
Флуоресценция и биолюми-несценция	Микроводоросли микроорганизмы, гидробионты	Инструментальное измерение интенсивности свечения	Гидрохинон 10^{-3} моль/л, гербициды: монурон $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л, бензол 10^{-10} моль/л
Биоэлектрическая реакция	Водоросли, рыбы, земноводные	Электрохимические измерения параметров крови: измерение электропроводности клетки и др.	Фенолы 10^{-5} моль/л и другие токсичные вещества
Хемотаксис	Микроорганизмы, гидробионты, простейшие	Измерение оптической плотности, визуальные наблюдения	Катионы тяжелых металлов, мюль/л: Ca^{2+} $8 \cdot 10^{-10}$, Ni^{2+} $8 \cdot 10^{-9}$, NH_4^+ $2 \cdot 10^{-7}$, пестициды
Ростовая реакция	Микроорганизмы, бактерии, водоросли, дрожжи	Измерение оптической плотности, визуальные наблюдения	Катионы тяжелых металлов, 2-нафтол 0,1 моль/л, анилина гидрохлорид 0,1 мг/л
Выживае-мость (гибель, иммобилиз)	Микроорганизмы, бактерии, водоросли, ин-фузории	Измерение оптической плотности, визуальные наблюдения	Эфиры тиокислот 0,01 мг/л, катионы тяжелых металлов, цианиды, кремний органические соединения
Генетиче-ские и мутагенные реакции	Микроорганизмы, водоросли, дафнии	Микроскопирование, визуальные наблюдения	Нефтепродукты 0,03 мг/л, соединения диметилсульфоксида 10^{-4} мг/л, фенолы 1 мг/л

Обобщенным показателем эффективности действия определяемого вещества на индикаторный организм является или выживаемость, или летальный исход.

Взаимодействие определяемого вещества с индикаторным организмом зависит от уровня его организации; выбор способа регистрации ответного сигнала зависит как от целей анализа, так и от механизма и глубины действия вещества на индикаторный организм. Ответный сигнал индикаторного организма на одно и то же вещество зависит от концентрации вещества: малые концентрации обычно

стимулируют процессы жизнедеятельности организма, высокие – угнетают. Существенное повышение концентрации биологически активного вещества приводит к летальному исходу.

Диапазон определяемых содержаний, как и предел обнаружения, зависит от ряда физико-химических и биологических факторов: направленности и продолжительности воздействия химического соединения на организм, температуры, pH среды, уровня организации индикаторного организма, его индивидуальных возрастных, половых особенностей и др. Предел обнаружения в большинстве случаев понижается с повышением температуры до известного уровня и с увеличением продолжительности наблюдения за индикаторными организмами.

При использовании микроорганизмов (бактерии, актиномицеты, дрожжи, плесневые грибы) в качестве аналитического индикатора наблюдают за изменением динамики роста как отдельной клетки, так и популяции в целом и сравнивают с контролем.

При изучении закономерностей роста и размножения под влиянием изменения химического состава питательной среды используются чистые культуры, создаются постоянные условия их роста (температура, pH, воздухообмен и др.) и учитываются фазы роста индикаторной культуры, характерные для большинства микроорганизмов.

Методы определения веществ с использованием микроорганизмов предполагают культивирование индикаторных культур на жидких или плотных питательных средах. В зависимости от характера среды оценку интенсивности роста (размножения, угнетения и др.) популяций осуществляют оптическими, диффузионными или электрохимическими методами (табл. 5.4).

Таблица 5.4 – Зоны токсичного действия ионов тяжелых металлов на гидробионты

Ионы	Тест-объект	24ч, 10 С		72ч, 30 С	
		ЛК$_0$*	JIK$_{100}$**	ЛК$_0$*	JIK$_{100}$**

Cu^{2+}	*Daphnia magna*	0,025	0,25	0,0001	0,025
Zn^{2+}	*Daphnia magna*	2,5	2,5	0,00025 – 0,001	0,125
Co^{2+}	*Daphnia magna*	0,125	2,5	0,0001	0,0005
Ni^{2+}	*Daphnia magna*	5,0		0,25	2,5
Cu^{2+}	*C. dipterum*	0,25	5,0	0,0001	0,025
Cu^{2+}	*A. aquaticus*	10,0	150	0,01	1 – 2,5
Zn^{2+}	*C. dipterum*	50,0	200 – 400	0,01 – 0,05	2,5 – 10,0
	A. . aquaticus	25,0	1000	0,05	10,0
Co^{2+}	*C. dipterum*	10,0	1000	0,0005	5,0
	A. aquaticus	5–10	200	0,0005–0,025	0,5

*ЛК$_0$ – летальная концентрация для отдельных особей;

**ЛК$_{100}$ – летальная концентрация для 100%-го количества особей.

РАЗДЕЛ 6. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА ПРОМЫШЛЕННЫХ ОТХОДОВ

6.1. Основные направления биологической переработки промышленных отходов

Промышленные отходы можно в первом приближении разделить на две категории: 1) отходы производств, основанных на использовании биологических процессов (производство пищевых продуктов, напитков, ферментация); 2) отходы химической промышленности. В первом случае отходы имеют различный состав и обычно перерабатываются путем биологического окисления, как это делалось традиционно в случае бытового мусора. Однако такой способ экономически невыгоден, и в настоящее время широко обсуждается вопрос о возможности уменьшения объема разбавленных сточных вод либо их непосредственного использования – трансформации (для получения биомассы или других ценных продуктов), или же путем извлечения из них ценных соединений.

В многочисленных и разнообразных отраслях химической промышленности образуется большое количество отходов, причем многие из них с трудом поддаются разрушению и длительное время присутствуют в среде. Поэтому часто перед обычной биологической переработкой отходов бывает необходимо провести их предварительную химическую или физическую обработку. Использование специфических микроорганизмов для расщепления ксенобиотиков

при переработке отходов еще не нашло широкого применения в промышленности, и тем не менее подобный подход представляется весьма перспективным. Это может быть:

1) деградация отдельных видов отходов in situ с помощью специализированных культур микроорганизмов или их сообществ;

2) введение специально подобранных культур в обычные системы переработки отходов;

3) ликвидация и обезвреживание разливов нефти;

4) извлечение металлов;

5) биологическая очистка газов от пахучих и вредных соединений (меркаптанов, сероводорода, цианида, хлорзамещенных углеводородов и т.д.);

6) получение биомассы из отходов;

7) превращение отходов в метан.

В результате широкого применения человекам продукции химической промышленности в окружающую среду попадают различные типы ксенобиотиков: пластмассы (пластификаторы), взрывоопасные вещества, добавки, полимеры, красители, поверхностно-активные вещества пестициды и органические соединения - производные нефти. Что касается бытового мусора, то для его переработки созданы широко применяемые системы, использующие активный ил и оросительные фильтры. Сточные же воды химической промышленности, как правило, не соответствуют возможностям подобных систем. Интенсивность переноса кислорода в ходе процессов, обычно протекающих в таких системах, бывает недостаточна для поддержания максимальной скорости окисления при участии микрофлоры. Эти процессы чувствительны также к колебаниям в загрузке реактора, особенно если токсичные вещества и ингибиторы поступают в систему в высоких и непостоянных концентрациях.

Проблему недостатка кислорода, возникающую при переработке отходов химической промышленности в обычно используемых системах на основе активного ила, пытались решить несколькими способами. В двух случаях

(распределитель с пробулькиванием и система “Анокс”) для увеличения скорости переноса газа использовали чистый кислород. В одной из новых систем переработки отходов – колонном эрлифтном ферментере, разработанном фирмой ICI – пошли по пути увеличения количества растворенного кислорода. В центральной части колонны имеется не доходящая до дна вертикальная секция, в которую сверху поступают отходы и повторно используемый активный ил, туда же вводится воздух. Когда смесь выходит из ферментера вверх по наружной секции колонны, давление в системе падает, что вызывает пробулькивание пузырьков воздуха. Благодаря высокому содержанию растворенного кислорода и турбулентности биомасса поддерживается в высокоактивном состоянии и становится более устойчивой по отношению к перегрузкам, а также к уменьшению аэрации и времени нахождения отходов в ферментере, особенно в случаях высококонцентрированных отходов.

Такие процессы с повышенной аэрацией устойчивы к резким перегрузкам отходами, не оказывающими токсического или ингибирующего действия. В случае же токсичных отходов более пригодными оказываются системы, в которых используются микроорганизмы, растущие в пленках. Такие популяции микробов не вымываются из системы, даже если на их рост и метаболизм оказывают неблагоприятное воздействие поступающие сточные воды. Кроме того, внутри пленки из-за ограничения диффузии создаются градиенты концентрации. Это приводит к понижению концентраций токсичных продуктов внутри пленки, а следовательно, к повышению скорости их усвоения и окисления. Пленка создает также экологическую нишу для организмов, рост которых в присутствии высоких концентраций отходов при перегрузках существенно замедляется. Самая простая форма пленочной системы – это перколяционный фильтр, однако подобного рода пленки разрушаются, если они становятся очень тонкими, при уменьшении концентрации субстрата на поверхности подложки. В таком случае клетки погибают и пленка отпадают, засоряя фильтры внутри системы переработки отходов. При слишком высоких концентрациях субстрата происходит быстрый рост микроорганизмов, что приводит к образованию толстой пленки и к ее

периодическому отслоению. Интенсивность подобных процессов можно снизить, разбавив поступающий раствор с питательными веществами, осветленными сточными водами. Разработка новых методов сохранения толщины пленки представляет безусловный интерес.

Так, при помощи медленного вращения диска из полистирола внутри протекающих сточных вод толщина пленки поддерживается постоянной за счет гидродинамических сил и аэрации при выходе пленки из воды. Такая эффективная и простая система была предложена для очистки стоков с низкой величиной БПК. Еще один эффективный метод переработки токсичных отходов in situ может быть основан на использовании реакторов с ожиженной подложкой, где микроорганизмы растут на поверхности небольших инертных частиц (песок, стекло, антрацит), через слой которых пропускают с контролируемой скоростью сточные воды и воздух.

Отходы, не содержащие азота или фосфора, не способны поддерживать рост микроорганшмов. В подобных случаях для окисления токсичных соединений до двуокиси углерода можно использовать покоящиеся клетки при условии, что активность их гидролитических и окислительных ферментов не подавляется. Поскольку среда при переработке отходов в колонных реакторах периодически меняется, микроорганизмы оказываются в условиях голодания и в это время их рост прекращается. При поступлении источника углерода на короткое время включается несопряженный метаболизм, когда организмы дышат, но не растут. Это дает то преимущество, что уменьшается общий выход биомассы (ила).

Рассмотрим методы биологической переработки промышленных отходов на примере молочной, бумажной промышленности и производства красителей.

6.2. Отходы молочной промышленности

Сыворотка является побочным продуктом сыроварения. Ее состав зависит от типа используемого молока и вырабатываемого сыра. В высушенном или концентрированном виде сыворотка применялась в качестве корма для животных; однако ее недостатком является то, что она несбалансирована с точки зрения

содержания питательных веществ: в ней слишком высока концентрация минеральных веществ и лактозы. Разработаны способы извлечения из сыворотки белков путем ультрафильтрации, осаждения иди выделения с помощью ионного обмена Из таких белков можно получать белковые гидролизаты, используя для этого ферментеры. После извлечения белков получают большие объемы фильтратов с высокими концентрациями лактозы (35 – 50 г/л), минеральных веществ, витаминов и молочной кислоты, и встает проблема дальнейшего их использования. Если превратить лактозу в молочную кислоту при участии молочнокислых бактерий, то мы получим источник углерода, который может сбраживаться дрожжами (например, смешанными культурами *Lactobacillus bulgarius* и *Candida krusei).* Возможно и прямое сбраживание лактозы дрожжами *Kluyveromyces fragilis* или *Candida intermedia.* После подобного сбраживания не обязательно отделять микроорганизмы от среды, объем которой можно уменьшить и получить обогащенную белком сыворотку.

Из сыворотки получают не только белковые продукты, но и (путем ферментации) сырье для химической промышленности (например, этанол). Путем химического гидролиза лактозы с последующим удалением глюкозы из раствора с помощью ферментации можно получать галактозу. Альтернативный биологический путь – использование мутантных дрожжей, лишенных β-галактозидазы. Такие мутанты сохраняют способность к гидролизу лактозы и используют образующуюся глюкозу в качестве источника углерода. В результате гидролиза лактозы фильтрат становится более сладким; на опытных установках такой гидролиз осуществляют с помощью иммобилизованной β-галактозидазы. Гидролизованный фильтрат не только находит применение в пищевой промышленности, но может оказаться полезным и при решении проблем, связанных с недостатком ферментов у некоторых животных-отъемышей и с непереносимостью лактозы у человека. Из сыворотки получают и другие химические соединения: лактозу, лактулозу, лактитол и лакто-бионовую кислоту.

6.3. Отходы целлюлозно-бумажной промышленности

Волокнистый материал, применяющийся при производстве бумаги и других

продуктов, получают как из древесных, так и из травянистых растений после химического расщепления лигнина. Однако этот процесс сопровождается потерей большого количества древесины и образованием огромного количества отходов. Все это должно стимулировать разработку альтернативной химической технологии.

В настоящее время применяют два процесса получения древесной пульпы. Основной из них – это щелочная варка (сульфатный процесс), в результате которой образуется темная сульфатная варочная жидкость. Эти отходы содержат трудно перерабатываемые ароматические продукты расщепления лигнина и низкомолекулярные органические кислоты (глюкоизосахариновую, молочную, уксусную и муравьиную). При получении пульпы из смолистой древесины сосны образуются талловое масло и терпены, широко использующиеся в промышленности. Сульфатную варочную жидкость не удается перерабатывать биологическими способами, которые могли бы применяться в промышленном масштабе; гораздо экономичнее упаривать эту жидкость и сжигать ее, получая таким образом энергию из отходов.

Сульфатная варка целлюлозы применяется реже; она дает отходы следующего состава: лигносульфонаты с ароматическими элементами (60 %), сахара (манноза, галактоза, глюкоза, ксилоза, арабиноза (36 %), уксусная кислота, метанол и фурфураль. Эти жидкие отходы – хорошее сырье для ферментации благодаря высокому содержанию в них углеводов. Их ферментация в широких масштабах начата в 1909 г. В настоящее время традиционным методом удаления пентоз, гексоз и уксусной кислоты из таких отходов служит их ферментация при участии дрожжей. Помимо этих традиционных методов, вскоре будут использоваться и новые процессы превращения отходов в грибной белок с помощью *Paecilomyces variotii, Sporotrichum pulverulentum* и *Chaetomicum cellulolyticum*. Неподдающиеся переработке соединения можно концентрировать и сжигать. Лигносульфонаты применяют в качестве связывающих веществ и вспомогательных средств при бурении; щелочным окислением при повышенном давлении их можно превращать в ванилин. Вообще говоря, главное в переработке

отходов целлюлозно-бумажной промышленности – это понижение энергозатрат, а какой химический принцип при этом используется, менее существенно.

Основная экологическая проблема, порождаемая целлюлозно-бумажной промышленностью, это очистка сточных вод, а также обработка конденсатов, образующихся в испарителях и реакторах Сточные воды осветляют путем нейтрализации и отстаивания, окисления в одно- и двухстадийных установках с активным илом, в аэрируемых отстойниках или путем сочетания биологических и химических способов окисления. Эти методы пригодны для эффективного удаления соединений, подверженных биодеградации, а также токсичных производных фенола, однако они оказываются дорогими и неэффектными в случае производных лигнина, с трудом поддающихся переработке. Отбеливатели, содержащие хлорпроизводные бифенилов, можно обесцвечивать с помощью грибов – возбудителей белой гнили.

Среди побочных продуктов сульфитного процесса получения целлюлозы преобладают химически модифицированные лигнины, образующиеся во многих реакциях между активным сульфитом и каким-либо сложным природным полимером. Структура лигносульфонатов в деталях неизвестна. Они представляют собой гетерогенную смесь соединений с широким спектром молекулярных масс (300–100000); состав смесей определяется природой перерабатываемой древесины. Образование сульфонатов приводит к частичной солюбилизации лигниновых фрагментов. Сложность структуры лигносульфонатов затрудняет изучение их биодеградации. Для упрощения задачи обычно используют модельные соединения, например дегидрополимеры кониферилового спирта или другие низкомолекулярные продукты. Низкомолекулярные лигносульфонаты чувствительнее к биодеградации, чем высокомолекулярные; с другой стороны, производные лигнина, видимо, устойчивее к разрушению, чем сам лигнин. Следовательно, образование сульфопроизводных затрудняет переработку.

В таких сопряженных окистительно-деградативных процессах почвенные грибы и бактерии более эффективны, чем гнилостные грибы; для осуществления

этих процессов требуется также дополнительный источник углерода. Распад лигносульфонатов нередко сопровождается полимеризацией, в результате чего наблюдается сдвиг в распределении полимеров по молекулярным массам. Эти изменения могут коррелировать с присутствием внеклеточных фенолоксидаз (например, лакказы), физиологическая роль которых остается неизвестной. Фенолы превращаются в соответствующие хиноны и фенокси-радикалы, которые спонтанно полимеризуются. Таким образом, полимеризация и деградация происходят одновременно. Однако в случае некоторых грибов реакции полимеризации не протекают в присутствии целлюлозы. Целлюлоза распадается до целлобиозы, являющейся субстратом для целлобиза: хинон оксидоредуктазы, которая одновременно окисляет целлобиозу и восстанавливает хиноны и фенокси-радикалы. Может существовать и другая оксидоредуктазная система, в которой легкодоступные источники углерода используются для восстановления хинонов. Возможная роль подобной биологической полимеризации состоит в облегчении осаждения лигносульфонатов. Лигносульфонаты применяются как связывающие вещества при производстве отдельных видов картона, где в качестве катализатора полимеризации используют содержащие лакказу культуральные фильтраты. Фенолоксидазы могут играть важную роль в определении судьбы многих ксенобиотиков в окружающей среде, участвуя в полимеризации фенолов и в образовании органических полимеров почвы.

Чувствительность лигносульфонатов к биодеградации увеличивается после их химической или физической модификации. Под действием УФ-облучения и озонирования происходит фрагментация этих молекул, а удаление остатков сульфоновой кислоты хотя и снижает растворимость лигносульфонатов, одновременно уменьшает их устойчивость к биодеградации. Предпринимались попытки использовать для микробного десульфирования анаэробные сульфатредуцирующие бактерии и некоторые виды *Pseudomonas*. Большими потенциальными возможностями в этом смысле обладают смешанные культуры. Использование таких культур для разрушения лигносульфонатов может оказаться более эффективным, чем применение отдельных штаммов, поскольку при этом

могут быть созданы сообщества с широким спектром активностей, например, способные к десульфированию, расщеплению прочных связей, метилированию и деполимеризации. В результате может быть получена высокоэффективная биоокислительная система. В одной из опытных установок для получения БОО из углеводов, содержащихся в отходах целлюлозно-бумажной промышленности, используют *Candida utilis*, а для разрушения остаточных лигносульфонатов – смешанную культуру. Биомасса, образующаяся на второй стадии этого процесса, не находит сбыта, поэтому ее повторно используют после термообработки для ускорения роста *Candida*.

6.4. Переработка отходов после очистки воды

6.4.1. Общие принципы очистки сточных вод

Тысячелетиями отходы деятельности человека перерабатывались естественным путем при участии соответствующих микроорганизмов. В наиболее широко распространенных установках для очистки сточных вод выполняются четыре основные операции.

1. При первичной обработке удаляются твердые частицы, которые либо отбрасываются, либо направляются в реактор.

2. На втором этапе происходит разрушение растворенных органических веществ при участии природных аэробных микроорганизмов. Образующийся ил, состоящий главным образом из микробных клеток, либо удаляется, либо перекачивается в реактор. По технологии, использующей активный ил, часть его возвращается в аэрационный тэнк.

3. На третьем этапе (необязательном) производится химическое осаждение и разделение фосфора и азота.

Для переработки ила, образующегося на первом и втором этапах, обычно используется процесс анаэробного разложения. При этом уменьшается объем осадка и количество патогенов, устраняется запах, а кроме того, образуется ценное органическое топливо – метан.

Сходные процессы применяют при переработке промышленных сточных вод, особенно в химической, пищевой, целлюлозно-бумажной промышленности.

Поэтому совершенно очевидно, что любые биотехнологические усовершенствования этих процессов найдут немедленное применение в промышленности. Такие усовершенствования могут быть направлены на увеличение мощности перерабатывающих установок, повышение выхода полезных побочных продуктов, на замену обычно применяемых синтетических химических добавок, устранение запаха и удаление металлов, а также не поддающихся переработке соединений.

6.4.2. Аэробная переработка отходов

Аэробная переработка стоков – это самая обширная область контролируемого использования микроорганизмов в биотехнологии. Она включает следующие стадии:

1) адсорбция субстрата на клеточной поверхности;

2) расщепление адсорбированного субстрата внеклеточными ферментами;

3) поглощение растворенных веществ клетками;

4) рост и эндогенное дыхание;

5) высвобождение экскретируемых продуктов;

6) “выедание” первичной популяции организмов вторичными потребителями.

В идеале это должно приводить к полной минерализации отходов до простых солей, газов и воды. Эффективность переработки пропорциональна количеству биомассы и времени контактирования ее с отходами. Системы аэробной переработки можно разделить на системы с перколяционными фильтрами и системы с использованием активного ила.

Переработка отходов с помощью активного ила, осуществляемая сложной смесью микроорганизмов, была предложена в 1914 г. Этот процесс более эффективен, чем фильтрация, и позволяет перерабатывать сточные воды в количестве, в десять раз превышающем объем реактора. Однако он обладает рядом недостатков: более высокими эксплуатационными расходами из-за необходимости перемешивания и аэрации; большими трудностями в осуществлении и поддержании процесса; образованием большого избытка

биомассы. Несмотря на все это, процесс, использующий активный ил, остается наиболее распространенным методом переработки сточных вод в густонаселенных районах, поскольку требует меньших площадей, чем эквивалентная фильтрационная система.

Как и в фильтрационные системы, в систему с активным илом были внесены некоторые изменения. Следующие из них связаны с аэрацией:

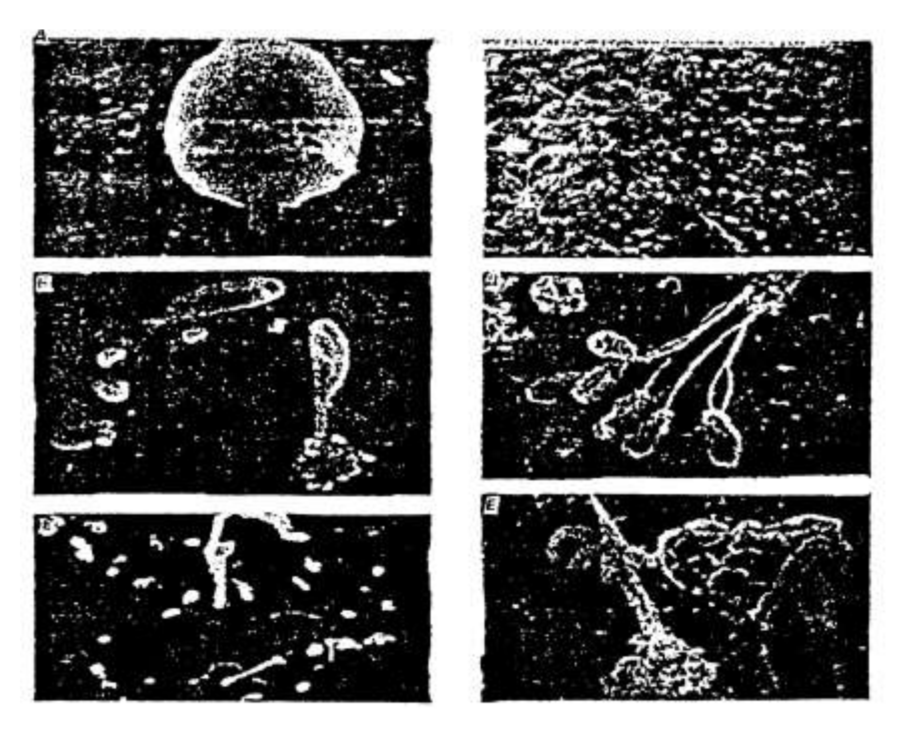
1 Градиентная аэрация, приводящая интенсивность аэрации в соответствие с потребностью в кислороде, которая на входе больше, чем на выходе.

2 Ступенчатая аэрация, при которой по всей длине тэнка сточные воды поступают с интервалами.

3 Контактная стабилизация, при которой повторно используемый ил аэрируется, что способствует более полной утилизации микроорганизмами любых доступных питательных компонентов. Это приводит к более полной ассимиляции отходов при возврате в основные рабочие тэнки. В результате объем ила на стадии аэробного разложения уменьшается, что в принципе аналогично увеличению аэрации.

4 Использование чистого кислорода в закрытых тэнках, которые поэтому могут работать при более высоких концентрациях биомассы; таким образом уменьшается время пребывания сточных вод в тэнке и, кроме того, решается проблема “разбухания” (избыточного роста нитчатых бактерий и грибов), препятствующего оседанию ила.

Активный ил – это истинно водная среда. Как и в перколящюнных фильтрах, основная группа бактерий, участвующих в процессе переработки, – это *Zoogloea*. Считается, что активно растет только небольшая часть флокуляционного ила По сравнению с перколяционными фильтрами в активном иле наблюдается меньшее экологическое разнообразие. Рост водорослей ограничивается недостаткам света, а виды и разнообразие присутствующих в иле простейших определяются степенью переработки отходов (рис. 6.1).



Микрофотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа: А – Epistylis (×1000); Б – стебельчатые бактерии (×16000); В – жгутиковые бактерии (×5000); Г – Vaginocolidae (×750); Д – колония Epistylis sp. (×350); Е – Vorticella sp. (×1000)

Рисунок 6.1 Микроорганизмы, присутствующие в активном иле

Для успешной переработки бытовых и промышленных отходов необходимо точно знать состав и концентрацию стоков. Это служит “руководством к действию”: зная качественные и количественные характеристики среды, можно сразу установить, какой микробный посевной материал необходим для инициации работы системы. Часто бывает трудно показать, что именно те микроорганизмы, которых выделяют из систем биологической переработки отходов, осуществляют окисление присутствующих соединений. Микробиологическое изучение любой системы, использующей активный ил, включает: 1) идентификацию микроорганизмов и определение их численности; 2) оценку микробиологической активности как популяции в целом, так и отдельных видов; 3) оценку соотношения между (1) и (2), с одной стороны, и количеством вводимых питательных веществ и продуктов переработки – с другой.

Микробиологическую активность активных илов можно оценивать по

приросту биомассы или по интенсивности общего метаболизма; последний включает изменения, происходящие в среде. Измерения могут проводиться и для какой-то отдельной популяции микроорганизмов. Можно показать, что активность ила связана с определенными бактериями, точно подсчитать их число и определить метаболическую активность. Далее можно выяснить, в какой мере та или иная специфическая активность ила определяется конкретными видами бактерий с известными свойствами, и установить, какое влияние оказывают на них неблагоприятные условия, в которых они оказываются из-за поступления в среду тех или иных питательных веществ или продуктов метаболизма других микроорганизмов. Для сточных вод, поступающих в емкость с активным илом, характерны высокие концентрации органических соединений и, следовательно, наличие больших количеств хемоорганотрофных видов, например *Achromobacter, Flavobaeterium, Pseudomonas* и *Moraxella* а также многих других бактерий. При высоких концентрациях неорганических соединений в стоках обнаруживаются бактерии *Thiobacillus, Nitrosomonas, Nitrobacter* и *Ferrobacillus* spp., окисляющие соответственно серу, аммиак и железо. Эти организмы были выделены из систем для переработки отходов и идентифицированы с помощью методов селективных культур. В ходе этих работ важно установить, играют ли какие-либо виды главенствующую роль в тех процессах, которые протекают в активном иле. Этот аспект часто недооценивается, особенно небиологами. Нередко бывает трудно однозначно установить роль того или иного микроорганизма. Например, если из системы по переработке отходов выделены *Thiobacillus,* окисляющие соединения серы, то это еще не означает, что вся активность такого рода определяется именно этими микроорганизмами: частичное окисление ряда соединений серы осуществляют и виды *Pseudomonas.*

Взаимосвязи между организмами, участвующими в катаболизме органических и неорганических субстратов, имеют важное значение для регуляции процессов, происходящих в активном иле. Промежуточные продукты метаболизма у одного вида бактерий способны оказывать влияние на процессы деградации у другого. Например, известно, что фенол подавляет активность

организмов, окисляющих аммиак: он может ингибировать этот окислительный процесс даже при столь малых концентрациях, как 3 – 4 мкг/л.

Промежуточные продукты расщепления бензойной кислоты до катехола, сукцината и ацетата ингибируют образование ферментов, участвующих в начальных этапах расщепления. Катехол и сукцинат подавляют синтез ферментов, разрушающих бензоилформиат и бензальдегид, по механизму обратной связи, а ацетат действует как катаболитный репрессор: наличие простого органического соединения подавляет расщепление более сложных молекул до тех пор, пока это более простое соединение не будет использовано. Когда ингибирование снимается, синтезируются новые ферменты, ответственные за расщепление более сложных ароматических структур. На практике при наличии в отходах гомологичных рядов каких-либо соединений необходимо образование ферментов, способных справиться с расщеплением самой сложной молекулы данного ряда. Полное расщепление таких соединений должно происходить в течение определенного минимального времени удержания (нахождения, отходов в реакторе) в процессе переработки. Следовательно, можно предсказать, какая обработка потребуется для окисления фенольных соединений; например, чем сложнее боковая цепь молекулы, тем больше времени необходимо для ферментативного разрушения этого вещества.

Эффективность данного процесса можно повысить, изучив механизмы регуляции метаболизма в микрофлоре систем с активным илом. Регуляция биодеградации – это сложная задача. Однако, зная биохимию соответствующих процессов, мы, по-видимому, сможем вмешиваться и в их регуляцию. Например, добавление к илу промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот в низких концентрациях (2–5 мг/л), глюкозы, аминокислот и витаминов (в частности, аланина и никотиновой кислоты) приводит к ускорению окисления ряда соединений. Введение этих промежуточных продуктов в состав биомассы увеличивает энергетические потребности системы, стимулирует синтез АТР за счет усиленного окисления неорганических веществ типа серы или аммиака. Понимание биохимии подобных процессов, видимо, даст возможность

вмешиваться в процессы регуляции метаболизма

Задача микробиолога-биотехнолога при разработке методов очистки сточных вод состоит в более полном изучении и учете взаимосвязи между активностью микроорганизмов, образованием хлопьев ила и производительностью установки по переработке отходов. В этом смысле превращения в системе активного ила следует рассматривать в основном как окислительные процессы во влажной среде, сопровождающиеся увеличением объема ила, которое можно расценивать как вредное или полезное (последнее – когда ил используется повторно). Совершенно очевидно, что биологический способ переработки пригоден для множества различных органических и неорганических соединений и устраняет их вредное воздействие на окружающую среду.

Термин "биодеградация" используется сейчас очень широко, но имеет множество толкований. Иногда под биодеградацией понимают полную минерализацию какого-либо соединения микроорганизмами с образованием углекислого газа, сульфата, нитрата и воды – это одна крайность. Другая крайность состоит в том, что данный термин используют применительно к незначительным изменениям соединений, приводящим к утрате ими некоторых характерных свойств. Стандартные методы оценки деградации позволяют определить термин "биодеградация" следующим образом:

1) первичная деградация, при которой характерные свойства исходного соединения утрачиваются и перестают выявляться специфическими химическими тестами;

2) допустимая для окружающей среды биодеградация, при которой происходит минимальное изменение исходного соединения, необходимое для утраты его свойств (оба этих определения основаны на произвольных критериях, и поэтому неточны);

3) окончательная биодеградация, включающая полное превращение исходного соединения в неорганические конечные продукты и связанная с нормальными процессами метаболизма микробов.

6.3.3. Анаэробное разложение

Все возрастающая стоимость переработки отходов с помощью аэробного разложения и энергетический кризис, с одной стороны, и новые достижения микробиологии и технологии – с другой, возродили интерес к анаэробной переработке. Самая распространенная технология анаэробной переработки – разложение ила сточных вод. Эта хорошо разработанная технология с успехом используется с 1901 г. Однако здесь существует рад проблем, обусловленных малой скоростью роста облигатных анаэробных метанобразующих бактерий, которые используются в данной системе. К ним относятся также чувствительность к различным воздействиям и неприспособленность к изменениям нагрузки. Конверсия субстрата также происходит довольно медленно, и поэтому обходится дорого. Некоторые проблемы связаны с неудачными инженерными решениями. Тем не менее, этот подход представляется перспективным с точки зрения биотехнологии; например, можно добавить к отходам ферменты для повышения эффективности процесса или попытаться усилить контроль за переработкой путем изменения тех или иных биологических параметров.

Анаэробная ферментация отходов или растительных культур, специально вы

ращиваемых для получения энергии, очень перспективна для экономичного получения газообразного топлива при умеренных температурах (30 – 35 °С). Эта новая отрасль биотехнологии была развита микробиологами в сотрудничестве с инженерами-химиками и механиками, работниками сельского хозяйства и экономистами.

При выращивании сообщества различных бактерий на смеси органических соединений происходят сложные биохимические реакции (рис. 6.2).

Метанобразующие бактерии способны к синтезу энергоносителя непосредственно из водорода и углекислого газа. Микроорганизмы, расщепляющие целлюлозу, синтезируют жирные кислоты, которые могут подвергаться восстановительному расщеплению до метана и углекислого газа; некоторые бактерии способны даже образовывать молекулярный водород.

Описано сложное, взаимозависимое микробное сообщество, в котором можно выделить три группы бактерий: бактерии, осуществляющие гидролиз и брожение, бактерии, образующие водород и уксусную кислоту, а также водородотрофные, метанобразующие бактерии. Метанобразующие бактерии растут медленно и очень чувствительны к резким изменениям загрузки реактора и накоплению водорода.



Рисунок 6.2 Биохимическое расщепление отдельных соединений до метана и углекислого газа при анаэробном разложении отходов

Можно надеяться, что усовершенствование конструкции реактора и контроль за процессом помогут уменьшить колебания загрузки реактора и позволят контролировать ее, определяя содержание водорода и промежуточных продуктов типа пропионовой и масляной кислот. Проблемы перегрузки, особенно

существенные в случае промышленных стоков, можно обойти, увеличивая скорости оборота и применяя в качестве буферных систем сточные воды химических предприятий и бытовые сточные воды. Для увеличения метаногенной активности бактерий можно использовать обычные методы отбора или методы генетической инженерии. Оценить возможность использования данного процесса при переработке смешанных отходов, а также охарактеризовать потребности в питательных веществах и усовершенствовать начальный этап процесса за счет уменьшения количества необходимого микробного посевного материала поможет дальнейшее изучение физиологии и экологии участвующих в процессе микроорганизмов.

Для получения энергии и полезных побочных продуктов можно использовать самые разнообразные отходы и сырье.

6.4. Биодеградация ксенобиотиков в окружающей среде

6.4.1. Участие микробных сообществ в биодеградации ксенобиотиков

Биодеградация органических соединений, загрязняющих окружающую среду, оправдана только в том случае, если в результате происходит их полная минерализация, разрушение и детоксикация; если же биохимическая модификация этих соединений приводит к повышению их токсичности или увеличивает время нахождения в среде, она становится не только нецелесообразной, но даже вредной. Детоксикация загрязняющих среду веществ может быть достигнута путем всего одной модификации структуры. Судьба ксенобиотика зависит от ряда сложным образом взаимосвязанных факторов как внутреннего характера (устойчивость ксенобиотика к различным воздействиям, растворимость его в воде, размер и заряд молекулы, летучесть), так и внешнего (pH, фотоокисление, выветривание). Все эти факторы будут определять скорость и глубину его превращения. Скорость биодеградации ксенобиотика данным сообществом микроорганизмов зависит от его способности проникать в клетки, а также от структурного сходства этого синтетического продукта и природного соединения, которое подвергается естественной биодеградации. В удалении ксенобиотиков из окружающей среды важную роль играют различные механизмы

метаболизма.

В большинстве случаев при исследовании биодеградации использовался традиционный подход, основанный на выделении и анализе свойств чистых изолятов из окружающей среды. С другой стороны, из-за гетерогенности среды в ней формируются местообитания для множества разных микроорганизмов с самыми разнообразными метаболическими свойствами. Эти местообитания не могут не быть взаимосвязанными друг с другом. Ксенобиотики подвергаются действию смешанных популяций микроорганизмов, т.е. сообществ, для которых характерны отношения кооперации, комменсализма и взаимопомощи.

Можно выделить стабильные сообщества, в которых взаимодействия между отдельными его членами дают им ряд преимуществ, в результате такая ассоциация становится более эффективной, чем отдельно взятые виды. Классификация микробных сообществ основана на характере взаимосвязей между отдельными видами.

1 Сообщества, в которых один или несколько членов не способны к синтезу тех или иных компонентов, необходимых для роста, этот дефицит покрывается за счет метаболической активности других членов сообщества. Сложность различных взаимоотношений в подобных сообществах может варьировать, но в любом случае взаимосвязи такого типа, по вей видимости, играют роль в деградации многих соединений. Например, сообщество из двух микроорганизмов, растущее на циклогексане, включает один из видов *Nocardia,* способный окислять циклогексан, но не способный к росту на нем одном, а также один из видов *Pseudomonas,* который поставляет другим видам необходимые для роста соединения, возможно биотин. Такие взаимосвязи могут быть облигатными для роста определенных видов или поставлять дополнительные питательные вещества, способствующие росту первично окисляющего организма и увеличению скорости деградации. Это со всей очевидностью показывает, что истинную скорость деградации ксенобиотиков в окружающей среде можно оценить, только учитывая возможности микробных сообществ, а не отдельных видов микроорганизмов.

2 Сообщества, в которых метаболиты, в какой-то мере подавляющие рост организма-продуцента или других организмов в том же местообитании, удаляются остальными членами сообщества.

3 Сообщества, в которых параметры роста одного или нескольких его членов изменяются так, что получается более конкурентоспособное сообщество, устойчивое к изменениям среды. Такое сообщество может стать менее чувствительным к ингибированию субстратом и приобрести способность справляться с перегрузками, возникающими в очистных системах.

4 Крайне важная роль микробных сообществ в деградации ксенобиотиков состоит в том, что они способны осуществлять совместную “метаболическую атаку” на субстрат. Отдельные члены такого сообщества, в отличие от сообщества в целом, не обладают метаболической активностью, необходимой для полной деградации данного соединения. Так, в лаборатории иногда не удается добиться минерализации какого-либо вещества, но происходит это потому, что деградацию тщетно пытаются осуществить с помощью одного вида микроорганизмов. Отмечалось также, что такого рода комбинированная метаболическая система может возникать в результате синтеза отдельными видами разных компонентов ферментного комплекса, с проявлением ферментативной активности только у целого сообщества (например, синтез активной лецигиназы двумя видами *Pseudomonas).*

5 Ранее подчеркивалась важность сопряженного метаболизма для расщепления ксенобиотиков. Микроорганизмы, растущие на одном субстрате, превращают его в другой в ходе одной идя нескольких ферментативных реакции. Эти реакции не связаны с ростом микроорганизма в том смысле, что в них не образуются промежуточные продукты, которые данный организм использовал бы для роста. Однако эти промежуточные продукты могут послужить источником углерода для других членов сообщества. Выделение или создание подобных сообществ для решения проблем загрязнения среды ксенобиотиками вполне реально, хотя о стабильности таких ассоциатов в условиях переработки отходов известно немного.

6 Были выявлены сообщества, в которых осуществляется передача восстановительных эквивалентов от одной популяции к другой. В анаэробных условиях классическим ферментативным способом получения избытка восстановительных эквивалентов было восстановление конечных продуктов обмена. Однако в упомянутых сообществах используется второй, акцепторный организм. На сегодняшний день уже выделено немало таких сообществ. Анаэробное разрушение подобными сообществами ароматических соединений может иметь экономическое значение.

7 При изучении непрерывных культур были обнаружены сообщества, в которых к полному использованию лимитирующего рост субстрата способна не одна, а несколько первичных популяций, хотя можно было бы ожидать, что наиболее конкурентоспособный организм окажется доминирующим. Следовательно, существующие в сообществе взаимодействия должны стабилизировать свободную конкуренцию между его членами.

В стабильных сообществах микроорганизмов создаются условия для свободного обмена генетической информацией между популяциями. Важным эволюционным механизмом появления новых штаммов in vito, способных взаимодействовать с новыми компонентами окружающей среды, может служить перенос плазмид между сообществами микроорганизмов.Частота таких событий для природных сообществ неизвестна, однако в условиях лаборатории они действительно происходят. Так, в одном из опытов в течение многих поколений выращивали смешанные непрерывные культуры разных видов *Pseudomonas.* Один из видов мог расти на хлоркатехолах, а другой обладал плазмидой TOL, несущей ген фермента бензолдиоксигеназы. На 4-хлорбензоате не мог расти ни один из штаммов, однако, использовав принцип обогащения, удалось выделить мутант, способный к росту на этой хлорсодержащей ароматической кислоте. По всей видимости, здесь произошел перенос плазмиды, в результате которого мутантный штамм приобрел способность к окислительному декарбоксилированию 4-хлорбензойной кислоты с помощью приобретенной диоксигеназы с широкой специфичностью, а следовательно, и способность к

росту на образующемся хлоркатехоле.

В свете взаимодействий подобного рода, существенных для окружающей среды, мы рассмотрим еще несколько специфических примеров деградации ксенобиотиков. Мы знаем, что в промышленных сточных водах содержатся стабильные побочные продукты реакций, часто известного состава. Вполне понятно, что технология контроля за ними хорошо разработана. Однако в окружающую среду могут попадать и сложные смеси промышленных продуктов, например, при разнообразных неспецифических выбросах на любом из этапов технологического процесса (утечки и т.п.). Деградация ксенобиотиков будет рассмотрена именно в этом контексте.

6.4.2 Биодеградация хлорпроизводных углеводородов

С-1- и С-2-хлорпроизводные углеводородов широко используются в качестве растворителей и представляют собой важный фактор загрязнения окружающей среды. Тем не менее о микробной деградации этих соединений известно немного. Были выделены организмы, способные к использованию дихлорметана, однако механизм его деградации до конца не выяснен. По-видимому, в результате первичного дегалогенирования, катализируемого какой-то галоидгидролазой, образуется хлорметанол, спонтанно разлагающийся до формальдегида.

Дегалогенирование галогензамещенных ароматических соединений происходит в основном после расщепления ароматических групп системы под действием диоксигеназ. Связь углерод-галоген становится лабильной после присоединения атома кислорода к углероду, связанному с галогеном, с образованием галогензамещенных катехолов. Относительно широкая специфичность ферментов начальных этапов катаболизма может обуславливать довольно быстрое превращение разных галогензамещенных ароматических соединений, хотя работа ферментов и осложняется стоическими и негативными индуктивными эффектами боковых групп-заместителей. Это пример участия обычных катаболических ферментов в первичной атаке на ксенобиотики. Галогензамещенные катехолы представляют собой ключевые метаболиты в деградации арилгалогенов. Они разрушаются путем *орто*-расщепления,

поскольку ферменты *мета*-расщепления необратимо инактивируются веществами, образующимися в ходе реакции. Обычные пирокатехазы расщепляют галогензамещенные катехолы с относительно низкой эффективностью, поэтому основное значение в деградации этих соединений приобретает раскрытие кольца. На последующих этапах метаболизма, включая циклоизомеризацию, происходит отщепление оставшихся замещающих групп кольца. На работе обычно применяемых очистных сооружений плохо сказываются перегрузки их отходами, содержащими хлорзамещенные ароматические соединения: путь *мета*-расщепления нарушается, а неэффективность *орто*-пути приводит к накоплению токсичных фенолов и темноокрашенных продуктов их самоокисления.

6.4.3 Биодеградация других замещенных простых ароматических соединений

При деградации арилгалогенов замещающие группы часто отщепляются на последних этапах катаболизма после разрушения ароматических колец системы. В случае сульфонированных ароматических соединений связь углерод-заместитель высокополярна и должна стать лабильной на первых же этапах, в противном случае всем последовательно работающим ферментам придется “иметь дело” с этой замещающей группой. Сульфонированные нафталины широко используются в качестве эмульгаторов и смачивающих агентов, а также при производстве азокрасителей; в обычных очистных сооружениях эти соединения не разлагаются микроорганизмами. Однако в непрерывной культуре одно из использующих нафталин микробных сообществ, выделенное из сточных вод, приобрело способность к расщеплению нафталинсульфоновых кислот. Первые этапы катаболизма включают диоксигенацию, удаление замещающей группировки и реароматизацию – ключевой этап, для которого необходима диоксигеназа с широкой специфичностью, способная к специфическому гидроксилированию по положению 1,2 кольца (рис. 14).

Рисунок 6.3 Элиминация остатка сульфоновой кислоты из молекулы нафталинсульфоновой кислоты

Нитротолуолы представляют собой токсичные компоненты сточных вод военных заводов, которые в природе быстро разрушаются. Однако они минерализуются не полностью, поскольку продукты их деградации (ароматические амины) конденсируются с карбоксильными группами биологических макромолекул, образуя полиамиды, которые, по-видимому, устойчивы к последующему действию микробов.

6.4.4. Биодеградация полиароматических углеводородов

Полихлорбифенилы (ПХБ) – это очень устойчивые соединения, которые долго остаются в окружающей среде и прочно адсорбируются биологическими и осадочными материалами. В почвах они практически не мигрируют, а микроорганизмы не могут их глубоко деградировать. ПХБ в пробах из окружающей среды отличаются по составу от ПХБ, получаемых в промышленности, поскольку они модифицируются природными системами. Микробная деградация бифенила осуществляется при участии систем катаболизма, сходных с известными для других ароматических углеводородов. С увеличением степени хлорирования скорость метаболизма падает. Сообщалось, что смешанные культуры микроорганизмов осуществляют деградацию промышленных ПХБ до неохарактеризованных углеводородов, при этом расщепляются преимущественно молекулы с более низкой степенью

хлорирования. Если замещающих группировок больше, чем в тетра-хлор-ПХБ, то молекула становится полностью резистентной. В большинстве работ исследовали превращения чистых изомеров ПХБ.

Бензпирен представляет собой устойчивое полиароматическое соединение, при деградации которого образуются канцерогенные гидрокси- и эпоксипроизводные. Он не минерализуется в системах активного ила, хотя было описано несколько культур микроорганизмов, способных частично метаболизировать этот продукт с помощью индуцибельных и неиндуцибельных гидроксилазных систем. При этом образуется сложная смесь конъюгированных производных.

Полистирол очень устойчив к биодеградации. Был описан процесс, в котором тонко измельченные автомобильные шины, изготовленные из стирол-бутадиеновой резины, частично разлагались микроорганизмами после добавления какого-либо поверхностно-активного вещества. Содержащиеся в шинах антиозонаты, антиоксиданты и ускорители вулканизации замедляют этот процесс; конечный продукт можно использовать для улучшения почвы. Имеются сообщения о росте сообщества микроорганизмов на стироле, в результате чего удаляется ингибитор полимеризации 4-трет-бутилкатехол. В результате свободнорадикальной полимеризации стирола происходит осаждение полистирола. Далее и этот полимер исчезает, что свидетельствует о способности данного микробного сообщества к разрушению полистирола.

6.4.5. Биодеградация пестицидов

Слив отходов производства пестицидов сегодня строго контролируется, технология очистки сточных вод или их детоксикации хорошо разработана, хотя остается сложной и многообразной. Она включает сначала экстракцию пестицидов растворителями, а затем обычную биологическую обработку. Для ликвидации непредусмотренных выбросов, происходящих при утечках или при промывке и замене контейнеров с пестицидами, подходящая технология пока отсутствует.

Пестициды попадают в окружающую среду и в результате использования их для обработки сельскохозяйственных культур. Большинство пестицидов расщепляются бактериями и грибами. Превращение исходного пестицида в менее сложные соединения нередко осуществляется при участии сообществ микроорганизмов. Были описаны различные стадии и промежуточные продукты процессов деградации ДДТ, идущей, например, в ходе сопряженного метаболизма и приводящей к полной минерализации этого стойкого пестицида Часто из среды, содержащей ксенобиотик, можно выделить сообщества такого рода, в которых он служит не основным источником углерода, а источником фосфора, серы или азота. Чрезвычайно высокая токсичность пестицидов зачастую утрачивается на первой же стадии их модификации. Это позволяет разработать относительно несложные микробиологические способы их детоксикации. Например, в результате гидролиза может значительно уменьшиться токсичность пестицидов или увеличиться вероятность биодеградации. Для этого хорошо было бы использовать внеклеточные ферменты, способные функционировать в отсутствие коферментов или специфических факторов и осуществлять детоксикацию разнообразных пестицидов. Это могут быть такие гидролазы, как эстразы, ациламиназы и фосфоэстеразы. Чтобы выбранный фермент можно было применять in situ, он должен обладать подходящей кинетикой в широком диапазоне температур и pH, быть нечувствительным к небольшим количествам растворителей и тяжелых металлов, не ингибироваться субстратом при концентрациях, характерных для содержимого очистных систем, а также хорошо храниться. В ряде случаев в качестве биологического агента детоксикации была испробована паратионгидролаза, выделенная из Pseudomonas sp. С ее помощью удалось удалить 94–98 % остаточного паратиона (около 75 г) из контейнера с пестицидом за 16 ч при концентрации субстрата 1% (по весу). Забуференные растворы (паратионгидролазы) использовали также для детоксикации паратиона в разливах на почве, где его концентрация, по-видимому, была весьма высока. Скорость разложения паратиона в этом случае зависела от типа почвы, влажности, буферной емкости раствора и концентрации фермента. При этом

значительные количества пестицида были обезврежены всего за 8 ч. Как показали лабораторные эксперименты, еще одна возможная сфера применения иммобилизованных ферментов – это очистка сточных вод. Были описаны гидролазы для детоксикации других пестицидов. Многие из них обладают широкой субстратной специфичностью, что открывает большие возможности для создания других простых систем детоксикации пестицидов.

В будущем подобные системы смогут применять при промывке промышленных химических установок и реакторов, ферменты в виде аэрозолей – для удаления пестицидов с поверхностей, а ферменты в сочетании с пестицидами – для быстрого разрушения пестицидов после их использования.

6.4.6. Биодеградация поверхностно-активных веществ

По чувствительности к биодеградации синтетические поверхностно-активные соединения, применяемые в быту и в промышленности как моющие средства, можно разделить на “жесткие” и “мягкие”. Анионные соединения этой группы, такие как алкибензолсульфонаты, в конце 50-х гг. XX в. привлекли к себе внимание тем, что они загрязняют окружающую среду (образование пены в водоемах). Сначала в продажу поступали “жесткие” детергенты, устойчивость которым придавали их разветвленные алкильные боковые цепи. Чтобы предотвратить их накопление в природе, промышленность добровольно перешла к производству не подверженных биодеградации линейных неразветвленных алкибезолсульфонатов. Разрушение этих поверхностно-активных соединений начинается с окисления концевых метильных групп, после чего за счет β-окисления идет расщепление линейных боковых цепей. Кольцевые структуры молекул обычно разрушаются после полной; деградации боковой цепи. Данный процесс осуществляется только в аэробных условиях, поскольку для начального окислительного этапа требуется кислород. Разветвленные молекулы не всегда оказываются устойчивыми, хотя процесс их β-окисления и затруднен. Механизм разрушения разветвленной цепи до конца не установлен. Связь углерод – сера является очень прочной, и это увеличивает биологическую инертность молекулы

детергента. Реакции десульфирования детально не изучены, но скорее всего в них участвуют гидроксилазы или монооксигеназы. По-видимому, далее сульфонатный остаток превращается в сульфат, возможно, с образованием сульфита в качестве промежуточного продукта. Есть основания считать, что десульфирование *мета*-расщепления ароматического кольца детерминируется плазмидами.

Алкисульфаты все чаще используются как моющие средства и в косметической промышленности, основную их массу составляют первичные алкисульфаты. Линейные сульфаты легко разрушаются, но этот процесс замедляется из-за наличия разветвленных участков. В первичной атаке этих молекул участвуют сульфатазы, образующие соответствующие спирты, которые подвергаются затем дальнейшему метаболизму. Необычность алкисульфатаз по сравнению с сульфатазами вообще состоит в том, что они атакуют связь С-О в группах C-O-S. Первичные и вторичные алкисульфаты индуцируют образование сложного комплекса сульфатаз.

Неионные детергенты применяются в быту, поскольку они облегчают смачивание и способствуют образованию эмульсий, их с успехом используют при производстве аэрозолей для сельского хозяйства и в косметической промышленности. Линейные первичные алкогольэтоксилаты минерализуются быстро и до конца, но более высокомолекулярные гомологи более устойчивы. Деградация осуществляется путем окисления концевых метильных групп и последующего β-окисления с образованием низкомолекулярных алканоатэтоксилатов, лишенных поверхностно-активных свойств. У вторичных алкогольэтоксилатов гидрофобная алкильная цепь разлагается с обоих концов за счет ω- и β-окисления. Имеющиеся в этих соединениях эфирные связи увеличивают их устойчивость к биодеградации. Были предложены возможные способы расщепления этих связей, в частности монооксигеназное расщепление, гидролиз, участие углерода: кислород – лиазы и окисление α-атома углерода эфирной связи с последующим гидролизом сложного эфира.

Имеющиеся в продаже детергенты редко содержат по весу более 30 % поверхностно-активного соединения. К числу остальных компонентов относятся

оптические отбеливатели, отбеливатели-окислители, вспомогательные пенообразователи, антикоррозийные добавки и, в ряде случаев, ферменты. Основную массу составляет носитель (наполнитель). Наполнители нужны для: 1) уменьшения концентрации свободного кальция и магния с целью предотвращения образования неорганических остатков, в противном случае выпадут в осадок соли щелочноземельных металлов и аниона детергента; 2) диспергирования агрегатов почвенных частиц и стабилизации почвенных суспензии.

Наполнители должны иметь хорошую буферную емкость и не вступать в нежелательные реакции с другими компонентами. В течение многих лег для этих целей использовали тринатрийфосфат, но он ускоряет зарастание внутренних водоемов. Процесс эвтрофикации водоемов может ускоряться в результате биодеградации и минерализации любого азотистого или фосфорного соединения. В поисках кандидатов на роль свободных от азота и фосфора наполнителей были выбраны синтетические карбоксиэфиры (карбоксиметилсукцинат (КМС), окисидиацитат (ОДА), этиленгликольдиацитат (ЭГДА), рис.6.4).

КМС: $COOH \cdot CH_2 \cdot O \cdot CH(COOH) \cdot CH_2COOH$

ОДА: $COOH \cdot CH_2 \cdot O \cdot CH_2 \cdot COOH$

ЭГДА: $COOH \cdot CH_2 \cdot O \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot O\,CH_2 \cdot COOH$

НТА: $N(CH_2 \cdot COOH)_3$

Рисунок 6.4 Структура некоторых органических соединений, пригодных для повышения эффективности детергентов

Изучение метаболизма КМС и его аналогов позволило понять, каким путем микроорганизмы приобретают способность к деградации новых ксенобиотиков Сам КМС быстро разрушается в природе; в начальной реакции участвует индуцибельная лиаза, расщепляющая молекулу КМС с образованием гликолата и фумората. Аналоги КМС оказались более стойкими, видимо, вследствие субстратной специфичности индуцируемых лиаз. Устойчивость этих аналогов не

связана с процессом их поглощения клетками, поскольку было показано, что они поступают в них при участии конститутивной системы транспорта цитрата. КМС-лиаза оказалась удивительно сходной с полигалактуронатлиазой; организмы развивающиеся на КМС. также хорошо растут на полигалактуронате. Это весьма показательный пример появления способности к деградации путем приобретения новой функции уже существующими ферментами. Возможно, что эта лиаза кодируется плазмидой. В качестве наполнителя широко использовался нитрилтриацетат (НТА), поскольку он подвержен быстрой биодеградации в системах активного ила и в речной воде.

6.5. Биотестирование как способ оценки токсичности объектов окружающей среды

Широкое применение разнообразных исходных веществ для изготовления строительных материалов, контактирующих с организмом, требует тщательнее проверки их возможного отрицательного воздействия на живые организмы.

При контакте строительных сооружении с биологически активной средой в нее могут мигрировать из строительных материала потенциально токсические вещества различного строения. Это и составные части строительной композиции, и разнообразные добавки, и продукты деструкции, образующиеся при изготовлении, эксплуатации и хранении строительных материалов. Все эти вещества могут оказывать гибельное воздействие на живые организмы.

Отсутствие в настоящее время достоверных сведений о взаимосвязи между токсичностью отдельных компонентов, входящих в состав строительных композиций, и условиями их производства и эксплуатации вызывает необходимость токсикологического контроля строительных материалов на разных стадиях их синтеза и использования.

Проводящиеся в настоящее время исследования строительных материалов на токсичность с использованием теплокровных животных дорогостоящи, трудоемки, продолжительны по времени и сложны для исполнения. Поэтому большую актуальность имеет поиск использования экспрессных и менее

трудоемких и дорогостоящих методов для токсикологической оценки строительных материалов.

Одним из перспективных методов анализа является метод биотестирования с помощью биологических тест-объектов (индикаторов). Биологические индикаторы реагируют на малейшее изменения состава окружающей среды и дают быструю информацию о биологической активности отдельных компонентов и их совокупности. Особенно эффективными могут быть данные методы, где речь идет о необходимости определения малых количеств токсических веществ.

Наиболее изученными микроорганизмами с точки зрения их использования в неорганическом анализе являются плесневые грибы рода *Asperqillus*. Данные о чувствительности грибов к действию нитратов металлов, найденной по угнетающему действию, представлены в табл.6.1.

Таблица 6.1 – Чувствительность плесневых грибов к некоторым нитратам металлов (минимальная и токсичная концентрация соли М)

Металл	Asp. niger	Asp. Uryzal	Asp. Coepi-tosus	Asp. terrens	Asp. awemori
Sr	$5 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-2}$	$7 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-2}$
Cr	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-2}$
Al	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-2}$
Pb	$5 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$
Zn	$5 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$
Cu	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$
Co	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$
Ni	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$
Aq	$5 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$
Cd	$1 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-5}$
Tl	$5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$
Hq	$1 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$

Токсическое воздействие этих металлов может быть соотнесено с различной глубиной и характером взаимодействия ионов с поверхностными ионогенными структурами клеток, что и приводит к нарушению нормального функционирования клеточной мембраны. Из табл.5 видно, что исследованные культуры наиболее чувствительны к нитратам Hq, Cd и Tl, токсическое действие

которых объясняется блокированием SH-групп молекул белка микроорганизмов. С использованием *Asp. niger* разработан метод определения 0,5–10 мкг кадмия, 0,2–10 мкг ртути (II) и 5–20 мкг таллия. Из анионов наиболее токсичными для исследованных грибов оказались H_2SO_4 и CrO_4^{2-}.

Жизненно важные элементы (Fe, Cu, Mn, Zn), участвующие в построении или активации ферментных систем, определяются по зоне стимуляции при весьма низком содержании. При этом исходят из того, что эффективность физиологического действия тех или иных элементов на растения и микроорганизмы принципиально не различается. Микробиологические методы анализа здесь более информативны, чем химические, так как позволяют определить не валовое содержание определяемого элемента, а его физиологически активные формы, влияющие на жизнедеятельность живых организмов. Таким образом, они позволяют наиболее полно охарактеризовать токсичность среды. Предел обнаружения Zn, Fe, Mn, Cu (индикатор *Asp. niger*) равен соответственно 0,01–0,001; 0,0002–0,0001; 0,00001–0,000001 и 0,002–0,001 мкг/мл.

Аналогичные задача могут быть решены и с использованием в качестве аналитических индикаторов бактерий. При этом необходимо учитывать, что антимикробное или каталитическое действие определяемого компонента может быть искажено присутствием неконтролируемых примесей.

По чувствительности исследованные в работе микроорганизмы можно расположить в следующем порядке:

$$\text{бактерии} \longrightarrow \text{плесневые грибы} \longrightarrow \text{актиномицеты}.$$

В литературе освещается большое разнообразие наблюдений влияния различных токсикологических факторов на жизнедеятельность беспозвоночных. Водные беспозвоночные, чаще всего ветвистоусые рачки, широко применяются для оценки санитарно-гигиенического состояния вод. В качестве аналитического сигнала используют некоторые физиологические показатели: выживаемость, поведенческие реакции, окраску тел погибших организмов и т.д. Патологические

процессы в зависимости от концентрации определяемого соединения могут быть быстрыми: сначала наблюдается общее возбуждение, переходящее в депрессию, и затем в результате нарушения деятельности органов движения, органов дыхания, кровеносной и нервной систем наблюдается потеря подвижности и летальный исход.

Наиболее исследованными и пригодными в качестве индикаторов являются дафнии, отвечающие раду требований: простота круглогодичного культивирования в лабораторных условиях, высокая чувствительность и определенная избирательность к действию разнообразных соединений, удобство наблюдения за объектом и возможность инструментализации биологического метода. Созданы методы, позволяющие с помощью дафний определить концентрацию сульфата меди при постоянстве других факторов.

Анализ литературных данных показывает взаимосвязь чувствительности организмов и некоторых свойств ионов, позволяющих предсказать приблизительные пределы обнаружения токсичных веществ.

Для определения токсичности строительных материалов в качестве тест-объекта были выбраны дафнии вида *Daphnia Magna Straus*.

Как свидетельствуют литературные данные, хотя предлагаемые тест-объекты находятся на низших уровнях филогенетической лестницы, использование их для оценки токсичности строительных композиций вполне возможно. Из-за примитивности строения у них отсутствуют дублирующие друг друга системы и механизмы, обеспечивающие гомеостаз. Вследствие этого они быстрее, чем высшие животные, реагируют на появление токсичных примесей в воде. В то же время процессы, происходящие на клеточном уровне, универсальны для всех биологических объектов – от самых простых до самых сложных, что позволяет в определенных пределах экстраполировать результаты, полученные в опытах на примитивных организмах и высших животных.

Однако токсичные вещества могут действовать не только как клеточные, но и как системные яды. В этом случае мы не будем наблюдать корреляции между результатами, полученными в опытах на одноклеточных животных.

Учитывая сказанное, необходимо использовать при биотестировании не менее двух тест-объектов, сочетая их с санитарно-химическими исследованиями. При этом получение отрицательного результата хотя бы по одному использованному методу должно свидетельствовать о неудовлетворительных санитарно-гигиенических характеристиках испытываемого материала. Одной из оптимальных сфер применения биотестирования может быть контроль качества исходного сырья и текущий контроль токсичности полимерных материалов и изделий из них в процессе производства и разработки новых композиций.

Биотестирование будет также иметь эффективное применение при контроле качества строительных материалов любой природы. При создании новых строительных материалов эти экспресс-методы можно применять на начальных и промежуточных стадиях для предварительной оценки токсичности материалов с последующей окончательной проверкой на теплокровных животных.

Предпринята попытка использования дафний вида *Daphnia magna i Ceriodaphnia* для оценки качества строительных материалов. Высокая чувствительность этих тест-объектов к токсичным компонентам в воде, используемой в качестве модельной среды, позволяет в короткое время (до 2 сут) дать предварительную оценку токсичности строительной композиции. Особенно важно применение биотестирования на стадии создания новых строительных материалов, включая выбор исходного сырья, поскольку оно характеризуется высокой простотой выполнения, низкими экономическими затратами и не требует дорогостоящей аппаратуры и высокой квалификации персонала.

Рассмотрена возможность применения биотестирования к предварительной оценке токсичности различных строительных композиций и исходных материалов для их производства. Строительные материалы являются многокомпонентными композициями, в которые входят кальций, магний, железо, алюминий, различные органические добавки-пластификаторы, замедлители и ускорители схватывания и т.д., другие соединения, которые при эксплуатации готовых изделий могут переходить в почву, подземные воды, воздух, оказывая токсикологическое воздействие на объекты окружающей среды.

Для испытаний были взяты образцы строительных материалов, состав которых указан в таблице 6.2.

Таблица 6.2 – Результаты токсичности строительных композиций

Название строительного материала	Основные компоненты строительного материала	Реакция на токсичность
БТИСМ-1	Гипс + подсолнечная лузга + шлам гальванического производства в соотношении 18:2:1	Токсичен
БТИСМ-2	Гипс + подсолнечная лузга + шлам гальванического производства в соотношении 9:1:1	Токсичен
ХИИТ-1	Активный ил со станции биологической очистки + опилки в соотношении 1:0,5	Токсичен
ХИИТ-3	Активный ил + опилки + $AlCl_3 \cdot H_2O$ в соотношении 1:0,5:0,2	Токсичен
№1	Цемент + древесные опилки	Не токсичен
№2	Цемент + древесные опилки	Не токсичен

Образцы строительных материалов измельчали до размера частиц около 0,1 мм, 50 г измельченного материала растворяли в 500 мл дистиллированной воды и выдерживали в термостате в течение суток при температуре 80 °С. Объем воды для растворения был продиктован количеством параллельных проб, температура и величина частиц были подобраны в результате предварительных опытов. Далее водные вытяжки образцов фильтровали и в фильтрат помещали тест-объекты, которыми служили дафнии вида *Daphnia magna* тест-критерием являлся процент погибших дафний по отношению к контролю.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Родионов А.И., Клушин В.Н., Систер В.Г. Технологические процессы экологической безопасности: Учебник для студентов технических и технологических специальностей. 3-е изд. перераб. и доп. − Калуга: Изд-во Н. Бочкаревой, 2000. − 800с.

2. Родионов А.И., Клушин В.Н., Торочешников Н.С. Техника защиты окружающей среды. Учебник для ВУЗов. 2-е изд. М.: Химия,. 1989. − 512с.

3. Беспамятнов Г.П., Кротов Ю.А. Предельно-допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде. Справочник. Л.: Химия, 1989. − 512с.

4. Оборудование, сооружения, основы проектирования химико-технологических процессов защиты биосферы от промышленных выбросов / Родионов А.И., Кузнецов Ю.Л., Зенков В.В., Соловьев Г.С. Учебное пособие для ВУЗов М.: Химия, 1985. − 352с.

5. Скурлатов Ю.И., Дука Г.Г., Мизити А. Введение в экологическую химию. М.: Высшая школа, 1994. − 400с.

6. Вторичное использование полимерных материалов / Под ред. Ю.Г. Любешкиной. − М.: Химия,. 1985. − 280с.

7. Пальчунов П.П., Сумароков М.В. Утилизация промышленных отходов. − М.: Стройиздат, 1990. − 352с.

8. Экологическая биотехнология. /Под ред. К.Ф. Форстера и Д.А.Дж. Вейза.− Л.: Химия, 1990. – 384 с.

9. Кузнецов А.Е., Градова Н.Б. Научные основы экобиотехнологии. – М. Мир, 2006 г. – 504 с.

10. Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии. В 2-х частях. М.: Мир, 1989. – 590 с.

11. Промышленная микробиология / Под ред. Н.С. Егорова - М.: Высш. шк., 1989. − 688 с

12. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник. −К.: НУХТ, 2009. − 336 с.

13. Відходи виробництва і споживання та їх вплив на ґрунти і природні води Навчальний посібник / За редакцією В. К. Хільчинського, Гальперин В.М. й др. // Пластические массы. 1978, −225 с.

14. Телитченко М.М., Остроумов С.А. Введение в проблемы биохимической экологии. – М.: Наука, 1990. – 288 с.

15. Карасевич Ю.Н. Основы селекции микроорганизмов, утилизирующих синтетические органические соединения. – М.: Наука, 1982. − 144с.

16. Биотехнология. Принципы и применение./ Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста и Дж. Джонса. – М. Мир, 1988. − 480 с.

Учебное издание

Гринь Светлана Александровна

Питак Инна Вячеславовна

Кошовец Николай Владимирович

Пономарёв Владимир Александрович

Биотехнологические процессы при переработке отходов

Учебное пособие

для студентов специальности «Экология и охрана окружающей среды»

Підписано до друку 02.12.2016. Формат 60×84/16. Ум. друк. арк. 9,75. Наклад 300 прим. Зам. № 54-16. Ціна договірна.

Видавництво ПП «Технологічний Центр», вул. Шатилова дача, 4, Харків, 61145

Надруковано в типографії ПП «Технологічний Центр», вул. Шатилова дача, 4, Харків, 61145